

IMPACTS MOLÉCULAIRES DIRECTS DE LA VOIE DES ŒSTROGÈNES ET DU
RÉCEPTEUR AUX ŒSTROGÈNES ER α DANS LE TISSU ADIPEUX BLANC
VISCÉRAL DE SOURIS SAINES OU ATTEINTES D'OBÉSITÉ

par

Martin Morin

Thèse présentée au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Novembre 2019

Le 14 novembre 2019

Le jury a accepté la thèse de Monsieur Martin Morin dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Nicolas Gévry

Directeur de recherche

Département de biologie - Université de Sherbrooke

Professeur André Tchernof

Évaluateur externe

École de nutrition - Université Laval

Professeur Pierre-Étienne Jacques

Évaluateur interne

Département de biologie - Université de Sherbrooke

Professeur Richard Blouin

Président-rapporteur

Département de biologie - Université de Sherbrooke

SOMMAIRE

La reproduction est un processus biologique qui est énergiquement coûteux pour les organismes. Une bonne communication avec le système impliquant le métabolisme énergétique doit être mis en place pour s'assurer que la reproduction se déroule correctement jusqu'à son terme. Ainsi, des hormones endocriniennes produites par le tissu adipeux interagissent aussi bien au niveau central que périphérique de manière endocrine, paracrine et autocrine afin de permettre le contrôle des tissus impliqués dans le métabolisme énergétique, ainsi que ceux impliqués dans la reproduction. Ces peptides bioactifs sécrétés par le tissu adipeux sont nommés adipokines. La leptine en particulier est en partie régulée par des voies dépendantes de l'œstradiol (E2). Plus intéressant, des souris portant une mutation inactivant le gène de la leptine (souris *ob/ob*) sont infertiles. L'administration exogène de leptine recombinante stimule le système reproducteur endocrinien et restaure la fertilité. De plus, des mutations dans le gène du récepteur de la leptine provoquent une résistance à la leptine se concluant par des dysfonctions reproductives.

Chez les mammifères, les hormones sexuelles, dont les œstrogènes particulièrement, stimulent, maintiennent et contrôlent la distribution des graisses dans l'organisme et le métabolisme du tissu adipeux blanc (WAT). Les œstrogènes régulent la masse graisseuse en stimulant la lipolyse par la modulation de l'expression des gènes affectant ainsi le dépôt, la différenciation et le métabolisme des adipocytes. Chez la souris, la perturbation de la synthèse des œstrogènes par ovariectomie ou par délétion du gène *Cyp19a1* codant pour l'aromatase entraîne une redistribution significative du stockage des lipides et une augmentation de la masse graisseuse totale. Réciproquement, dans ces modèles de souris, un traitement aux œstrogènes restaure le métabolisme normal des lipides. De plus, la masse adipeuse chez la femme augmente lors du déclin en

œstrogènes survenant à la ménopause, ce qui représente un autre exemple physiologique clair de l'effet anti-adipogénique des œstrogènes.

Les relations des voies de signalisation de l'E2 avec les tissus impliqués dans la reproduction et le métabolisme des graisses a un intérêt majeur dans la compréhension des interactions qui existent entre ces deux fonctions. Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires connectant la reproduction, les voies de signalisation E2/ER α (récepteur aux œstrogènes ER α) et le métabolisme des lipides chez les mammifères sont connus, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore flous.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le rôle moléculaire de ER α dans l'établissement d'une réponse transcriptionnelle spécifique au tissu adipeux. Nous avons exploré cette question par localisation de ER α au niveau de la chromatine et par identification des gènes dont l'expression est dynamiquement régulée par l'E2. Nous avons alors déterminé que la voie E2/ER α induit une activation du métabolisme des adipocytes par une oxydation privilégiée des lipides par rapport au glucose, ce qui est concordant avec ce qui peut être observé chez la femme ménopausée subissant un traitement aux œstrogènes. Nous avons de plus conclu que la dépense énergétique était accrue dans les adipocytes traités à l'E2 grâce à l'augmentation de l'activité du cycle de Krebs et à un découplage de la chaîne de transport des électrons.

Dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur le rôle de ER α dans un cas physiopathologique : l'obésité. En effet, l'obésité est associée avec des changements épigénétiques majeurs dans les adipocytes, tels que la méthylation de l'ADN au niveau des doublets CpG (cytosine-guanine). Nous avons de plus observé une perte de réponse à l'E2 des gènes cibles de ER α identifiés précédemment, et une perte du recrutement de ER α à ses sites de liaison dans les adipocytes. Nous avons ensuite relié ces résultats avec une fermeture de la chromatine et une perte des marques d'activation au niveau de ces sites de liaison. Ensemble, ces résultats nous ont permis de conclure que le WAT développe une résistance aux œstrogènes associée au développement de l'obésité.

Ce projet de recherche a ainsi permis de poser des bases moléculaires aux rôles physiologiques de l'E2 et de ER α sur l'expression des gènes dans les tissus impliqués dans le métabolisme énergétique. Nous avons ensuite observé qu'une situation

physiopathologique comme l'obésité est associée avec une résistance aux effets des œstrogènes. Dans l'ensemble, les résultats de ces projets de recherche ont permis d'identifier des cibles importantes des œstrogènes et de ER α pouvant potentiellement être utilisées pour traiter des pathologies comme l'obésité.

Mots clés : Récepteur aux œstrogènes α (ER α), tissu adipeux blanc (WAT), œstradiol (E2), métabolisme énergétique, obésité, chromatine, épigénétique.

REMERCIEMENTS

Il y a de nombreuses personnes que je souhaiterais remercier et qui ont participées, scientifiquement ou non, à l'élaboration des projets décrits dans ce manuscrit de thèse.

Dans un premier temps je voudrais remercier particulièrement mon directeur de thèse, Nicolas Gévry, pour cette chance qu'il m'a donnée de poursuivre ma thèse dans son laboratoire. Sa confiance, son écoute et ses conseils m'ont permis d'évoluer autant humainement que scientifiquement. J'ai eu plaisir à grandir au sein de l'environnement de travail qu'il m'a fourni tout au long de mon doctorat.

J'aimerais aussi remercier Stéphanie Bianco, que j'ai côtoyée du début à la fin de mon doctorat. J'ai conscience d'avoir éreinté sa patience avec le nombre incalculable d'interrogations que j'avais, toutefois elle m'a toujours laissé profiter de son expérience scientifique et je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie spécialement Chantal Nadeau pour l'aide qu'elle m'a apportée à l'animalerie et pour sa bonne humeur communicative.

Je remercie aussi Alain Lavigueur pour son aide, son temps et son regard critique apporté dans l'écriture d'article.

Un grand merci aussi à Richard Blouin et Pierre-Etienne Jacques pour les conseils avisés tout au long de mon doctorat. Ils ont ainsi permis ma maturation scientifique ainsi que de celle de mes projets de thèse. Je remercie aussi Luc Gaudreau de m'avoir conseillé pendant les deux premières années de mon parcours de doctorat.

Je remercie aussi Mylène Brunelle, Joannie Connell, Maïka Jangal, Lysianne Papineau, Shirley Caron, Crysta Spino, Fatma Kharrat, Mélanie Breton-Larrivée, Florence Gagnon et Olivier Mayer membres actuels et passés du laboratoire pour l'aide, le soutien moral et la bonne ambiance dans le laboratoire.

Je voudrais féliciter et remercier tous les membres des laboratoires de Sébastien Rodrigue, de Luc Gaudreau, de Richard Blouin et d'Alexandre Maréchal (trop nombreux pour tous les nommer), d'avoir supporté ma présence pendant ces dernières années.

Je voudrais aussi remercier ces personnes qui se sont succédées à mes côtés pour toutes les activités en dehors de la thèse, en particulier Pascal Marrot, Michaël Belliveau, Vincent Baby, Catherine Chamberland, Samuel Rouleau, Dominick Matteau, Mathieu Dalpé-Mainville, Marie-Eve Pépin, et les membres de la ligue de hockey cosom intra-muros de l'Université de Sherbrooke.

Je souhaiterais aussi remercier ma moitié, Anne Gouraud, pour le soutien de tous les jours, pour toutes les relectures, pour ne pas avoir perdu patience et pour les deux petites championnes qu'elle m'a permis d'avoir : Sarah et Lucie.

Finalement, j'aimerais remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) puisque sans leur soutien financier, cette thèse n'aurait pas été possible.

TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	iv
TABLES DES MATIÈRES	vi
LISTE DES ABBREVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
Chapitre 1 : INTRODUCTION GENERALE	1
1.1. La stéroïdogénèse : synthèse des hormones stéroïdiennes	1
1.2. La transcription et sa régulation.....	7
1.3. Le récepteur aux œstrogènes ER α	21
1.4. Les fonctions du métabolisme énergétique	31
1.5. Rôles des œstrogènes et de ER α dans le métabolisme énergétique	42
1.6. Objectifs et hypothèses	60
Chapitre 2 : ER α governs a specific gene expression program and metabolic function in white adipose tissue.	61
2.1. Abstract	63
2.2. Introduction.....	64
2.3. Results	66
2.4. Discussion	75
2.5. Material and methods	78
2.6. Acknowledgements	82
2.7. Author contributions	82
2.8. Competing interests	83

2.9. Supplemental figure legends	84
2.10. Supplemental figures.....	86
2.11. References	94
Chapitre 3 : Impacts de l'obésité sur la réponse aux œstrogènes dans le tissu adipeux blanc murin	100
3.1. Introduction.....	100
3.2. Résultats	102
3.3. Discussion	111
3.4. Matériel et méthodes	113
3.5. Bibliographie.....	117
Chapitre 4 : Discussion Générale	119
4.1. Rôles moléculaires de ER α dans le tissu adipeux blanc	120
4.2. La voie E2/ER α et la voie de l'insuline dans le vWAT	126
4.3. Association entre l'obésité et la voie E2/ER α	129
4.4. Effets non-génomiques de ER α	131
4.5. Conclusion.....	135
Bibliographie.....	137

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

5mC	5-méthyl-cytosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGL	Acide gras libre
ancSR	Récepteur aux hormones stéroïdienne ancestral
ARC	Noyau arqué de l'hypothalamus
ArKO	Souris KO pour le gène de l'aromatase
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase II
AR	Récepteur aux androgènes
ATGL	Lipase des triglycérides adipocytaire
ATP	Adénosine triphosphate
BAT	Tissu adipeux brun (<i>brown adipose tissue</i>)
BRE	Eléments de reconnaissance B
CpG	Doublet Cytosine-phosphate-Guanine
CTCF	Facteur de liaison à CCCTC
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DHT	Dihydrotestostérone
DNMT	ADN méthyltransférase
E1	Œstrone
E2	17β-œstradiol
E3	Œstriol
ERα	Récepteur aux œstrogènes α
ERαKO	Souris KO pour le gène ERα
ERβ	Récepteur aux œstrogènes β
ERβKO	Souris KO pour le gène ERβ
ERE	Elément de réponse aux œstrogènes
FERKO	Souris KO pour le gène ERα spécifique aux tissus adipeux
GPÉR	Récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G
GPÉRKO	Souris KO pour le gène GPÉR
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HFD/HF	Régime riche en gras (high fat diet)
HSL	Lipase sensible aux hormones
HRT	Traitement de remplacement des hormones
IRS1	Substrat du récepteur à l'insuline 1
IRS2	Substrat du récepteur à l'insuline 2

JAK	Kinase Janus
KO	Invalidation génétique (acronyme de "knock-out")
LBD	Domaine de liaison au ligand
LERKO	Souris KO pour le gène de ER α spécifique au foie
MAGL	Lipase des monoacylglycérides
MBD	Domaine de liaison au 5mC
MCF7	Acronyme de " <i>Michigan Cancer Foundation 7</i> " (lignée cellulaire)
MERKO	Souris KO pour le gène de ER α spécifique aux muscles
MR	Récepteur aux minéralocorticoïdes
NFD/NF	Régime standard contrôle (Normal fat diet)
ob/ob	Souris KO pour le gène de la leptine (gène obèse)
PIC	Complexe de préinitiation
POMC	Pro-opiomélanocortine
PR	Récepteur à la progestérone
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
scWAT	WAT sous-cutané
SERM	Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes
SOCS	Suppresseur de la signalisation des cytokines
SR	Récepteur aux hormones stéroïdiennes
StAR	Protéine de la régulation aiguë stéroïdogénique
TAF	Facteurs associés à TBP
TBP	Protéine de liaison aux séquences TATA
TG	Triglycéride
TSS	Site d'initiation de la transcription
UCP1	Protéine découplante 1
VMN	Nœud ventro-médiant de l'hypothalamus
vWAT	WAT viscéral
WAT	Tissu adipeux blanc (<i>White adipose tissue</i>)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Acétylations et méthylations de l'histone H3 et leur lien avec la transcription.....	10
Tableau 1.2	Affinité des SERM les plus courant pour ER α , ER β et GPER.....	30
Tableau 3.1	Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.....	114
Tableau 3.2	Amorces de ChIP-qPCR utilisées dans cette étude.....	116

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	La stéroïdogénèse.....	3
Figure 1.2	Le nucléosome et la structure de la chromatine.....	8
Figure 1.3	Mécanismes épigénétiques généraux de l'activation de la transcription.....	14
Figure 1.4	Mécanismes épigénétiques généraux de la répression de la transcription.....	15
Figure 1.5	Formation du cœur du complexe de préinitiation (PIC).....	17
Figure 1.6	Finalisation de l'initiation de la transcription.....	18
Figure 1.7	Activation d'un enhancer et collaboration avec le promoteur pour initier la transcription.....	20
Figure 1.8	La famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes.....	22
Figure 1.9	Modes d'action de ER α	26
Figure 1.10	Les différentes voies de différenciation des adipocytes.....	33
Figure 1.11	Schéma général de la voie de l'insuline.....	35
Figure 1.12	Catabolisme des lipides et β -oxydation.....	38
Figure 1.13	Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les adipocytes.....	45
Figure 1.14	Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les cellules musculaires squelettiques.....	51
Figure 1.15	Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les hépatocytes.....	55
Figure 1.16	Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les cellules β des ilots de Langerhans.....	57
Figure 2.1	Tissue-specific effects of E2 treatment on the ER α cistrome of tissue involved in energy metabolism.....	67

Figure 2.2	CEBPB is associated with ER α at vWAT-specific ER α binding site.....	70
Figure 2.3	ER α and E2 affect the expression of genes that are involved in metabolic pathways.....	72
Figure 2.4	Impact of E2 treatment on activity of enzymes involved in energy metabolism in vWAT.....	74
Figure 3.1	Les souris nourries avec un régime occidentalisé accumulent plus de graisse par rapport à des souris nourries avec un régime standard.....	103
Figure 3.2	Les gènes cibles de la voie E2/ER α répondent moins efficacement à l'E2 dans le WATv des souris nourries avec un régime riche en gras.....	104
Figure 3.3	Les sites de liaison de ER α dans le vWAT liés aux processus de dégradation des lipides et à la voie de l'insuline sont hyperméthylés chez les souris nourries avec un régime riche en gras.....	106
Figure 3.4	Un enhancer putatif de Pgr et le site de liaison de ER α sont hyperméthylés chez les souris nourries avec un régime riche en gras.....	107
Figure 3.5	La chromatine est moins accessible aux régions méthylées dans les souris HF comparées aux souris NF.....	108
Figure 3.6	ER α est moins recruté aux enhancers plus méthylés en condition HF.....	109
Figure 3.7	La fixation de ER α à la chromatine entraîne moins de déposition de la marque de la chromatine H3K27ac synonyme d'activation...	110
Figure 3.8	Les expressions de Dnmt1 et Dnmt3a sont diminuées par le traitement à l'E2.....	111

Chapitre 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. La stéroïdogénèse : synthèse des hormones stéroïdiennes

Les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdiennes qui, comme leur nom le laisse sous-entendre, sont toutes synthétisées à partir du cholestérol via la stéroïdogénèse (figure 1.1). L'expression spécifique des enzymes de la stéroïdogénèse détermine le sécrétome des cellules, permettant ainsi aux cellules de la granulosa de sécréter de l'E2, aux cellules lutéales de la progestérone et aux cellules de Leydig de la testostérone.

Les enzymes essentielles de cette voie de synthèse font partie de la famille des cytochromes P450^{1,2}. Pour résumer, les cytochromes P450 sont responsables de la biosynthèse des stéroïdes, des lipides, des stérols, du cholestérol ou encore du métabolisme des médicaments et sont regroupés en deux familles³. Les cytochromes P450 de types I sont d'origine mitochondriale et sont localisés à la mitochondrie et ceux de type II sont d'origine eucaryote et localisés au réticulum endoplasmique lisse¹. Trois enzymes de la famille CYP11, des cytochromes P450 de type I, et trois enzymes des

familles CYP17, CYP19 et CYP21, des cytochromes de type II sont essentielles à la stéroïdogénèse¹. StAR (protéine de la régulation aiguë stéroïdogénique) est aussi une protéine essentielle à la stéroïdogénèse, permettant le transport du cholestérol de la membrane externe des mitochondries vers leur membrane interne, bien que son rôle précis reste à être caractérisé².

StAR est l'étape limitante de la stéroïdogénèse permettant le transport à la mitochondrie et le clivage par CYP11A1 au niveau du carbone 20 du cholestérol² (figure 1.1). Il en résulte une progestagène : la prégnénolone, qui est à la base du reste des hormones stéroïdiennes¹. La synthèse des hormones sexuelles à partir de la prégnénolone se poursuit dans le réticulum endoplasmique lisse. Notamment, CYP17A1 est l'enzyme qui permet la formation des androgènes à partir des progestagènes. CYP19A1, autrement appelé aromatase, est l'enzyme qui permet la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes. La progestérone, la dihydrotestostérone, la testostérone et l'œstradiol sont les quatre hormones sexuelles majeures au niveau de leur production et de leurs effets physiologiques.

Deux autres classes d'hormones sont produites par la stéroïdogénèse : les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. À partir des progestagènes, CYP21A2 suivi de CYP11B1 permet la production de cortisol, le principal glucocorticoïde. Le cortisol est principalement produit par les glandes surrénales et permet principalement la libération de glucose par le foie. L'aldostérone, le principal minéralocorticoïde, est issu des progestagènes aussi, mais via les enzymes CYP21A2 et CYP11B2. L'aldostérone est connue pour son rôle dans la régulation osmotique de l'organisme et dans le transport des sels minéraux.

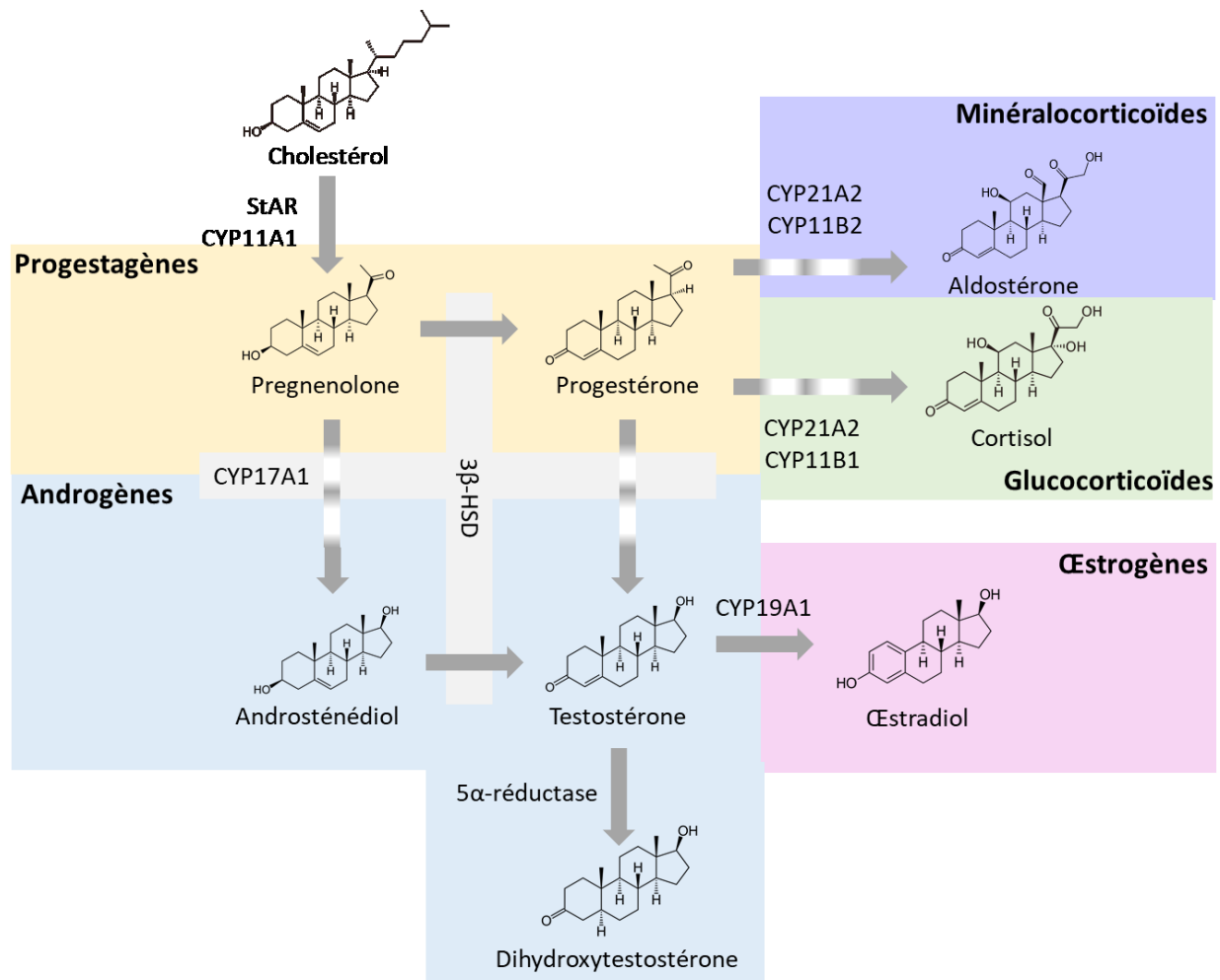


Figure 1.1 : La stéroïdogénèse (inspiré de Boron et al.⁴)

Le cholestérol est importé dans les mitochondries par la protéine StAR, et clivé au sein de la mitochondrie pour former la prégnénolone. La progestérone est formée à partir de ce composé par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), seule enzyme de la stéroïdogénèse à ne pas appartenir à la famille des cytochromes P450. CYP17A1 permet la conversion des progestagènes en androgènes dont la testostérone (trois réactions sont nécessaire pour former la testostérone à partir de la progestérone). La testostérone est convertie en dihydrotestostérone par la 5 α -réductase ou en œstradiol par l'aromatase. Les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes sont formés à partir de la progestérone. Les cytochromes CYP11 sont localisés dans la mitochondrie alors que les autres enzymes sont présentes dans le réticulum endoplasmique. Les fonctions chimiques caractéristiques de chaque hormone permettant sa reconnaissance par un récepteur spécifique. Les enzymes de la stéroïdogénèse sont exprimées de manière spécifique au tissu : les cellules des follicules ovariens exprimeront l'aromatase pour produire des œstrogènes alors que les cellules testiculaires de Leydig l'exprimeront peu pour produire de la testostérone. Les tissus cibles de la testostérone exprimeront la 5 α -réductase pour produire de la dihydrotestostérone.

Les actions des hormones stéroïdiennes se font via l'activation de membres de la sous-famille 3 des récepteurs nucléaires appelés les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, qui ont la particularité de dériver tous d'un récepteur stéroïdien ancestral commun^{5,6}.

1.1.1. Les œstrogènes

Les œstrogènes composent une famille d'hormones stéroïdiennes comprenant principalement l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'œstriol (E3). Comme mentionné précédemment, l'E2 est la principale hormone de cette famille au niveau de sa production et de son activité. Son action passe par deux récepteurs nucléaires⁷⁻⁹, ER α et ER β , ainsi qu'un récepteur couplé aux protéines G^{10,11}, GPER. L'expression des récepteurs dans la plupart des tissus fait des œstrogènes des hormones capables d'affecter de nombreux système : la reproduction, le métabolisme énergétique, l'immunité ou encore le système cardiovasculaire pour n'en citer que quelques-uns¹²⁻¹⁴. En effet, la ménopause par exemple est associée à de nombreux désordres métaboliques qui peuvent être contrecarrés par la prise d'un traitement de remplacement des hormones (HRT)^{15,16}. Les modèles murins d'ovariectomie ou d'inhibition de l'aromatase mènent au même phénotype que la ménopause, avec des symptômes pouvant être aussi annulés par un traitement à l'E2¹⁷⁻²⁰.

La production des œstrogènes est totalement dépendante de l'expression d'une enzyme appelée aromatase ou CYP19A1. Les cellules de la granulosa dans l'ovaire, les cellules de Leydig dans le testicule, mais aussi le tissu adipeux, le foie et le muscle cardiaque sont connus pour leur expression de l'aromatase et donc leur production d'œstrogènes²¹. Plus précisément, l'expression de l'aromatase est dépendante de nombreux promoteurs spécifiques aux tissus, amenant ainsi l'expression d'un exon 1 spécifique dans chacune des lignées cellulaires exprimant l'aromatase²¹. L'expression de l'aromatase dans des tissus mâles et des tissus non-reproducteurs supporte aussi l'impact majeur et non limité à la reproduction des œstrogènes qui sera détaillé tout au long de ce manuscrit.

1.1.2. Les androgènes

Les deux androgènes les plus actifs sont la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Leurs actions se font aussi via un récepteur nucléaire : le récepteur aux androgènes (AR).

La testostérone ayant une demi-vie plus longue que la DHT, c'est elle qui est retrouvée dans le système circulatoire^{22,23}. A l'inverse, la DHT a une activité plus importante sur AR et porte donc la majorité des effets physiologiques des androgènes^{22,23}. Localement, la testostérone est ainsi convertie en DHT par deux isoenzymes appelées les 5 α -réductases de type I et II. La 5 α -réductase de type I est encodé par le gène *Srd5a1* et est exprimée dans les tissus périphériques ce qui la rend responsable des caractères sexuels secondaires^{23,24}. La 5 α -réductase de type II est exprimée par le système reproducteur et permet notamment la différenciation des canaux de Wolf en appareil reproducteur masculin chez le fœtus, et sa déficience entraîne des troubles dans la différenciation sexuelle²³⁻²⁵.

Tout comme les œstrogènes, les androgènes sont importants pour de nombreux systèmes tels que la reproduction ou le métabolisme énergétique²⁶. Il existe un lien clair entre les concentrations sériques de testostérone et la taille des dépôts de tissu adipeux ainsi qu'avec la sensibilité à l'insuline chez les mâles^{27,28}. Cette protection semble néanmoins dépendante de l'aromatisation de la testostérone en E2 puisque des rongeurs orchidectomisés traités avec de la testostérone ne deviennent pas obèses alors qu'avec un traitement à la DHT (non-aromatisable en E2) ils le deviennent^{29,30}. AR n'est pas sans action non plus puisqu'une invalidation génétique du gène entraîne une augmentation des dépôts de tissus adipeux viscéraux^{31,32}.

Les androgènes ont des rôles antagonistes entre les mâles et les femelles^{33,34}. Chez le mâle, les androgènes participent au maintien d'un phénotype mince, un hypoandrogénisme étant associé à une accumulation de lipides dans les dépôts de tissu adipeux et une prédisposition au diabète de type II^{34,35}. À l'inverse, chez la femelle, un hyperandrogénisme est associé à l'augmentation des dépôts de tissu adipeux viscéral, à la résistance à l'insuline et à la dysfonction des cellules β des îlots de Langerhans³³⁻³⁵.

Dans l'ensemble, ces données supposent des interactions et une collaboration particulière entre la testostérone, la DHT, l'E2 ainsi qu'entre AR et ER α , permettant l'homéostasie du métabolisme énergétique.

1.1.3. Les Progestagènes

La progestagène la plus active de l'organisme est la progestérone qui est produite par le corps jaune durant la phase de dioestrus du cycle œstral. Son action se fait par l'intermédiaire du récepteur à la progestérone ou PR.

Les effets de la progestérone sur le métabolisme énergétique sont moins étudiés que ceux des androgènes et des œstrogènes sûrement à cause de leurs effets délétères sur cette fonction. En effet, la progestérone et PR sont associés à une augmentation de l'expression de gènes lipogéniques dans le WAT ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline, contrecarrant même les effets des œstrogènes lors d'un co-traitement^{36,37}. La progestérone augmente la masse des souris femelles après un traitement sur le long terme, un résultat qui n'est néanmoins pas retrouvé chez les mâles³⁷. La progestérone est aussi associée à une diminution de la lipase sensible aux hormones (HSL) nécessaire à la dégradation des stocks de lipides dans les adipocytes³⁸. Un exemple physiologique particulièrement parlant de ce phénomène est la gestation qui est caractérisée par une importante concentration sérique de progestérone et par une augmentation de la taille des dépôts de tissus adipeux³⁹. L'opposition entre la progestérone et l'E2 est alors particulièrement visible lors du cycle menstruel/œstral opposant la phase de folliculogenèse (forte concentration sérique d'E2) à la phase lutéale (forte concentration de progestérone) dans le métabolisme des lipides.

1.2. La transcription et sa régulation

Comment parler de récepteur nucléaire sans parler de la transcription et de sa régulation. Bien que les récepteurs nucléaires possèdent de nombreux effets non-génomiques, il est clair que la régulation de la transcription est la finalité majeure de leur voie d'activation. Cette partie s'articulera donc autour des acteurs majeurs de la transcription et de ses processus de régulation qui permettent dans un organisme d'avoir des cellules aux fonctions différentes, et ce à partir d'un même ADN.

1.2.1. La chromatine et ses états

La chromatine est une structure nucléoprotéique constituant la charpente de la régulation de l'expression génique. Elle est composée de l'ADN, de protéines appelées histones permettant le contrôle de l'état de compaction de la chromatine, mais aussi de multiples autres protéines telles que les facteurs de transcription ou les ARN polymérases. La chromatine joue ainsi un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes, dans la réparation des bris d'ADN, ou dans le maintien de structure comme les centromères, les nucléoles ou encore la coiffe télomérique⁴⁰.

Les histones sont des petites protéines de moins de 20 kDa permettant la compaction de la chromatine et il en existe cinq appelées histones canoniques : H1, H2A, H2B, H3 et H4 (figure 1.2). Leur premier rôle essentiel est de faire tenir environ 2 m d'ADN linéaire dans un noyau d'une taille d'environ 5 à 20 μm de diamètre. H2A, H2B, H3 et H4 sont responsables de la structure de base de la chromatine appelée le nucléosome (figure 1.2). Le nucléosome est constitué d'un octamère d'histone canonique constitué de deux paires de H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel s'enroule environ 147 pb (paires de bases) d'ADN⁴¹. Il s'agit du premier niveau de compaction appelé fibre de 10 nm ou "collier de perle" à cause de son aspect en microscopie électronique, la "perle" étant le nucléosome. Le niveau supérieur de compaction est dû à l'histone H1, permettant la liaison et un rapprochement entre les nucléosomes et formant ainsi les fibres de 30 nm de largeur⁴².

Le niveau de compaction de l'ADN permet, comme mentionné plus haut, de ranger l'ADN dans le noyau. Cependant, il agit aussi comme un frein physique à la machinerie de transcription⁴⁰. En effet, le positionnement des nucléosomes est loin d'être aléatoire et des gènes peu ou pas exprimés seront plus compactés que des gènes fortement exprimés permettant ainsi l'expression spécifique aux tissus des gènes. Les histones sont des protéines basiques dont la charge positive assure une certaine stabilité de liaison avec l'ADN^{43,44}. Cette stabilité peut être augmentée ou diminuée en fonction de modifications post-traductionnelles des queues N-terminale des histones ou par l'incorporation de variants non-canoniques d'histones au sein des nucléosomes⁴⁵. Chacune de ces marques de la chromatine possèdent trois classes non-exclusives d'interacteurs : les éditeurs, qui peuvent déposer ou retirer une marque et les lecteurs, qui vont être responsables des interactions.

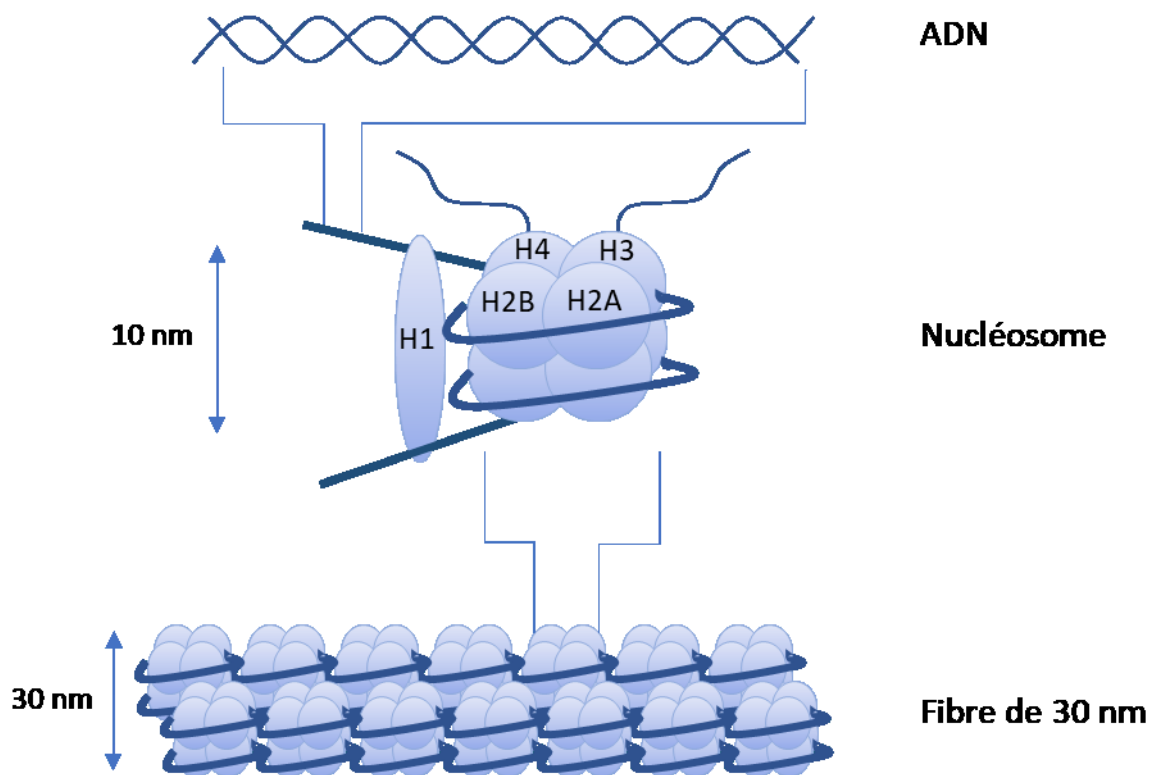


Figure 1.2 : Le nucléosome et la structure de la chromatine

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine permettant la compaction de l'ADN, mais est aussi impliqué dans de nombreux processus comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. Le nucléosome est un octamère composé des histones H2A, H2B, H3 et H4, présent chacun en deux exemplaires. Une cinquième

histone, H1, permet le rapprochement de nucléosomes adjacents. Chaque histone comporte une queue N-terminale non-repliée pouvant subir de multiples modifications post-traductionnelles affectant l'affinité des histones pour l'ADN ainsi que le recrutement de facteurs intervenant dans les processus de transcription, réplication ou réparation de l'ADN (ici seul les queues H3 et H4 sont représentées mais H2A et H2B comportent elles aussi une queue). Le rapprochement des nucléosomes, grâce à l'histone H1, forme une fibre compacte de 30 nm de largeur. Il s'agit ici des étapes de condensation les plus faibles, la fibre de 30 nm peut encore se replier pour former des fibres de 300 nm et 700 nm qui à leur niveau de compaction le plus élevé donne le chromosome métastatique.

1.2.1.1. Les marques d'histone et la transcription

Le niveau de compaction de la chromatine n'est pas le seul aspect permettant la régulation de la transcription par la chromatine. Chacune des histones est composée d'une queue N-terminale contenant de nombreux résidus aminés pouvant subir une modification post-traductionnelle comme des acétylations et des méthylations principalement, bien que l'on puisse compter en tout 12 modifications post-traductionnelles répertoriées à ce jour (tableau 1.1)⁴⁵. Ces modifications peuvent affecter la charge électronique des histones et altérer ainsi la liaison entre les histones et l'ADN et donc l'état de compaction et l'ouverture de la chromatine⁴⁶. Particulièrement, l'acétylation des histones est connue pour perturber l'affinité des histones pour l'ADN en neutralisant leurs charges positives⁴⁶. Il en résulte une réduction de la compaction de l'ADN permettant ainsi le recrutement de facteurs de transcription généraux tels que TAF1 (facteur associé à TATA 1) aux promoteurs et l'initiation de la transcription⁴⁷⁻⁴⁹. Les histones acétylées ont aussi une plus grande mobilité le long de l'ADN⁵⁰. La méthylation des histones est à l'inverse généralement associée avec une compaction de la chromatine, une baisse de la transcription des gènes associés ainsi qu'une baisse de la mobilité des histones^{50,51}. Les modifications post-traductionnelles des histones sont finement régulées par une série d'enzymes et leurs antagonistes⁴⁵ : par exemple, les histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC) pour respectivement transférer un groupement acétyle sur une lysine ou pour le retirer, les histone méthyltransférases et histone déméthylases pour les groupements méthyles.

Modifications post-traductionnelles	Résidu	Rôle
Acétylation	H3K9ac	Associée aux promoteurs, liée avec la transcription
	H3K18ac	Associée aux promoteurs, liée avec la transcription
	H3K27ac	Associée aux promoteurs et enhancers, liée avec la transcription
Méthylation	H3K4me1	Associée aux enhancers, plutôt liée avec l'activation ⁵²
	H3K4me2	Associée aux promoteurs et aux enhancers, plutôt liée à l'activation ⁵²
	H3K4me3	Associée aux promoteurs, plutôt liée à l'activation
	H3K9me1	Retrouvée autour des TSS actifs ⁵² , associée à la répression de gènes ⁵³
	H3K9me2	Associée aux gènes réprimés ⁵²
	H3K9me3	Associée aux gènes réprimés ⁵²
	H3K27me1	Légèrement associée avec les promoteurs actifs ⁵²
	H3K27me2	Corrélée avec la répression de la transcription ⁵²
	H3K27me3	Corrélée avec la répression de la transcription ⁵²
	H3K36me1	Plutôt associée à l'activation des gènes ⁵²
	H3K36me2	Plutôt associée à l'activation des gènes ⁵⁴
	H3K36me3	Associée aux gènes hautement transcrits ⁵²

Tableau 1.1 : Acétylations et méthylations de l'histone H3 et leur lien avec la transcription

Ce tableau représente une liste non-exhaustive des acétylations et des méthylations survenant sur la queue N-terminale de l'histone H3. La nomenclature utilisée est la suivante : H3K27ac = histone H3 acétylée sur la lysine 27.

Les modifications post-traductionnelles des histones forment des domaines séparant les régions exprimées des régions non-exprimées et cartographiant ainsi le génome en fonction des éléments génétiques présents : ce qui est communément appelé le code des histones. Comme exemple, la marque H3K9me3 est généralement associée à des régions fortement réprimées tels que les centromères^{55,56}. D'autres régions sont plus associées avec les éléments régulateurs de la transcription tels que les promoteurs et les enhancers. Les promoteurs sont particulièrement associés avec la marque H3K4me3, pas forcément synonyme de transcription active mais très conservée entre les tissus^{57,58}. A l'opposé, la marque H3K4me1 est très présente dans les éléments distaux de régulation de la transcription, pas forcément associée non plus à une activation de l'élément de régulation⁵⁷. Contrairement aux régions enrichies en H3K4me1, celles enrichies en

H3K4me3 sont spécifiques aux tissus suggérant que ce sont les régions de régulation distales qui font la spécificité d'un tissu⁵⁸. Une autre marque d'histone associée à la régulation de la transcription est H3K27ac, associée aussi bien aux promoteurs qu'aux enhancers les plus actifs^{59,60}.

1.2.1.2. Les variants d'histone et la transcription

Parallèlement, des complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP peuvent utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP afin de déplacer ou d'évincer des nucléosomes, contrôlant ainsi l'accessibilité de la chromatine et la transcription^{40,61}. Les complexes de remodelage de la chromatine ont aussi la capacité de modifier la composition des nucléosomes en échangeant une histone canonique par un variant de cette histone. Les variants d'histones ont des rôles essentiels dans la transcription^{62,63}, la ségrégation des chromosomes⁶⁴ ainsi que dans la réparation de l'ADN⁶⁵. Plus précisément, H3.3 et H2A.Z sont les deux variants caractérisés dans la régulation de la transcription⁶³. H3.3 remplacent les histones canoniques H3 dans les nucléosomes situés au niveau des promoteurs, des enhancers, des corps des gènes, des sites de terminaison de la transcription ainsi qu'aux télomères⁶⁶⁻⁷⁰. Le roulement (ou renouvellement) des nucléosomes contenant H3.3 aux promoteurs, aux enhancers et particulièrement aux super-enhancers est plus important, rendant l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription à ces régions⁶⁷. H3.3 colocalise ainsi avec la présence de l'ARN polymérase II (ARN-pol II) au niveau des promoteurs et du corps des gènes, l'associant avec l'activation de la transcription⁷¹. La présence des marques d'histones H3K4me1, H3K4me3, H3K9ac et H3K27ac, associées aux promoteurs et aux enhancers transcriptionnellement actifs, corrèle avec un plus fort roulement des nucléosomes contenant H3.3^{69,70}.

Parallèlement, le variant d'histone H2A.Z est aussi retrouvé au niveau des promoteurs et des enhancers, bien que sa distribution varie dans le cycle cellulaire : en effet, durant la phase S jusqu'à la mitose, la localisation de H2A.Z au niveau des promoteurs et enhancers est perdue au profit des centromères⁷². Dans les cellules HeLa, les

nucléosomes contenant H3.3 et H2A.Z sont retrouvés dans les régions les plus accessibles du génome comme les régions les plus appauvries en nucléosome⁷³ ou au niveau des sites de liaison à CTCF, un répresseur de la transcription⁷³. H2A.Z a un rôle contrasté autant positif que négatif sur l'activité transcriptionnelle des enhancers. En effet, dans certains cas, la présence de H2A.Z est associée avec l'activation de la transcription, comme au niveau des enhancers les plus actifs de ERα⁷⁴, et dans d'autre cas, il peut être responsable de la déposition de marque répressive comme H3K27me3⁷⁵. P400, le remodeleur de la chromatine responsable de l'échange H2A-H2B avec H2A.Z-H2B est retrouvé aux promoteurs, aux enhancers et dans les régions codantes dans les cellules U2OS et est requis pour le maintien autant de H2A.Z que de H3.3 à ces régions⁷¹. D'autres études *in vitro* montrent que H3.3 pourrait être aussi incorporé par p400 suggérant que p400 aurait un rôle dans le dépôt des nucléosomes H2A.Z-H3.3⁴⁰.

Dans l'ensemble, ces résultats pointent vers une collaboration entre les marques d'histones et les variants d'histones dans la cartographie des régions génomiques et dans le contrôle de la transcription.

1.2.1.3. La méthylation de l'ADN et la transcription

La méthylation directe de l'ADN est la marque épigénétique étudiée depuis le plus longtemps. C'est un processus biologique par lequel un groupe méthyle est ajouté à un CpG (une cytosine suivie d'une guanine), formant ainsi une 5-méthylcytosine (5mC)^{76,77}. Comme les autres marques, il existe des éditeurs écrivains et effaceurs ainsi que lecteurs de la méthylation⁷⁸. Les enzymes appelées les DNA méthyltransférases (DNMTs) sont responsables de l'ajout de cette modification⁷⁹. La méthylation est souvent associée avec la répression de l'expression bien que récemment des études montrent qu'une activation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN peut exister⁷⁸. La méthylation des CpG est un processus très conservé dans l'évolution malgré quelques différences notoires faisant de ce processus un élément important de la régulation de la transcription^{77,78}. Contrairement à certains arthropodes tel que *Drosophila melanogaster* qui possède très peu d'ADN méthylé, les vertébrés possèdent de nombreux domaines

appelés îlots CpG, des régions riches en ce doublet de nucléotides^{78,80}. Ces îlots CpG sont particulièrement enrichis au niveau des promoteurs puisque la moitié environ y sont retrouvés^{77,80}. L'autre moitié des îlots CpG se situe dans des régions intragéniques et intergéniques et sont appelés îlots CpG orphelins. Il existe ainsi une forte corrélation entre la présence de la marque H3K4me3 et les îlots CpG puisque 70% des promoteurs environ possèdent un îlot CpG⁸¹. Les îlots CpG orphelins ne sont pas à écarter de la régulation de la transcription non plus puisque l'ARN-pol II activée et la marque H3K4me3 sont associées avec ces régions dans 40% des cas⁸². A l'opposé, les îlots CpG méthylés sont corrélés négativement avec la présence de marques plutôt associées à l'activation de la transcription comme H3K4me2 et H3K4me3 ainsi qu'avec H2A.Z⁸³⁻⁸⁵.

Les lecteurs principaux connus de la méthylation CpG sont les protéines contenant le domaine de liaison aux methyl-CpG (MBD)^{86,87}. La vision traditionnelle de l'impact de la méthylation CpG est que les facteurs de transcription et les protéines responsables de l'initiation de la transcription n'ont plus accès aux promoteurs et aux enhancers directement à cause de la méthylation (empêchant la reconnaissance des motifs de liaison) ou par liaison des protéines MBD (en masquant les motifs de liaison) empêchant ainsi l'activation de la transcription. L'un des exemples le plus frappant de l'effet de la méthylation CpG sur l'expression est l'inactivation d'un des chromosome X chez les femelles vertébrées⁷⁸. Bien que la méthylation ne soit pas l'évènement initiateur de la répression génique du chromosome X (des marques de répression telles que H3K27me3 apparaissent plus tôt), c'est la marque qui évite une fuite de transcription, puisqu'elle est plus stable et plus difficile à effacer⁷⁷. Les protéines MBD sont de plus capables de recruter des corépresseurs avec une activité HDAC afin de désacétyler les lysines des histones, ajoutant un autre niveau de répression de la transcription⁷⁷. La méthylation est souvent un évènement précoce intervenant dans la différenciation, comme le montre les gènes marqueurs de lignée germinale tels que ceux de la famille MAGE ou les gènes associés à la pluripotence⁸⁸.

Néanmoins, des données récentes montrent que la méthylation de l'ADN est associée à 30 % à des régions ouvertes de la chromatine et que certains facteurs de transcription connus sans domaine de liaison MBD sont présents à ces régions malgré une méthylation

supérieure à 80%⁷⁸. D'autres études montrent que des facteurs de transcription comme C/EBP α ⁸⁹, POZ⁹⁰ (doigt de zinc et virus pox) ou ZFP57/KAP1^{91,92} (protéine associée à KRAB) peuvent se fixer spécifiquement à une version de leur motif méthylé. Des études à grande échelle ont montré que certains facteurs de transcription avaient plus d'affinité pour l'ADN méthylé sans domaine MDB⁹³. Ces données à l'échelle du génome ne sont pas directement associées à des données sur la transcription, mais des cas particuliers où la méthylation CpG est associée à l'activation de l'expression de gènes ont déjà été rapportés⁸⁹. Dans ces cas, la méthylation se passe au niveau des CpG contenus au sein des motifs de liaison des facteurs de transcription : dans certains cas la méthylation du motif diminue l'affinité du facteur pour son motif et dans d'autre cas découverts plus récemment, l'affinité augmente⁹⁴⁻⁹⁶. Ces données montrent un nouveau niveau dans la régulation de la transcription de l'ADN méthylé qui reste encore à être développé.

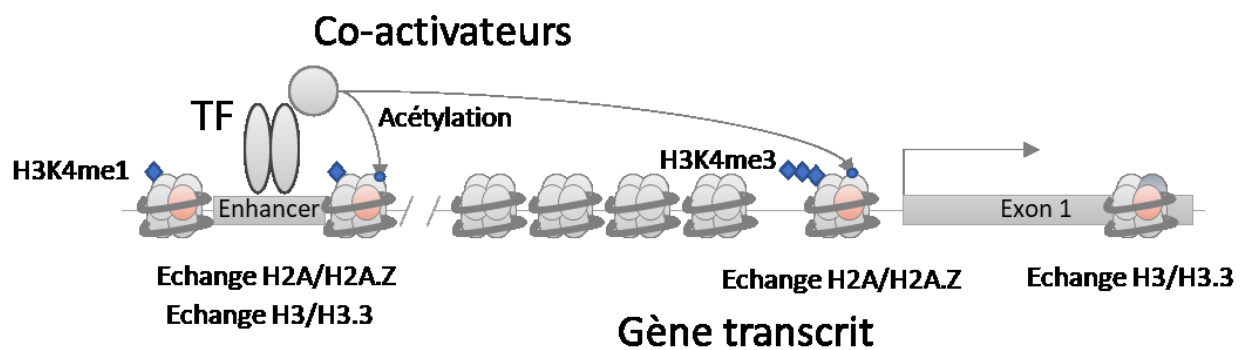


Figure 1.3 : Mécanismes épigénétiques généraux de l'activation de la transcription

Cette figure représente les marques épigénétiques liées à l'activation de la transcription d'un gène. Les enhancers sont marqués grâce à H3K4me1 d'une manière spécifique au tissu. Cette marque est la conséquence du recrutement de facteur pionnier à ces sites de liaison et est associée à une accessibilité accrue de l'ADN. Les motifs de liaison étant plus accessibles, un facteur de transcription reconnaissant ce motif peut alors se fixer et recruter à son tour des coactivateurs (généralement des HATs). L'activation de l'enhancer est aussi associée à l'échange entre H2A et H2A.Z à ces sites de liaison. Les HATs sont associées à l'acétylation de multiples lysines des histones, en particulier celles de la queue de l'histone H3 (H3K9, H3K18 et H3K27) au niveau de l'enhancer et du promoteur par repliement de l'ADN (et contact physique entre l'enhancer et le promoteur). La région promotrice activée est associée avec une plus grande accessibilité de l'ADN, permettant le recrutement de TAF1 et a posteriori de l'ARN polymérase II, et à la présence des marques H3K4me3, H2A.Z et H3.3.

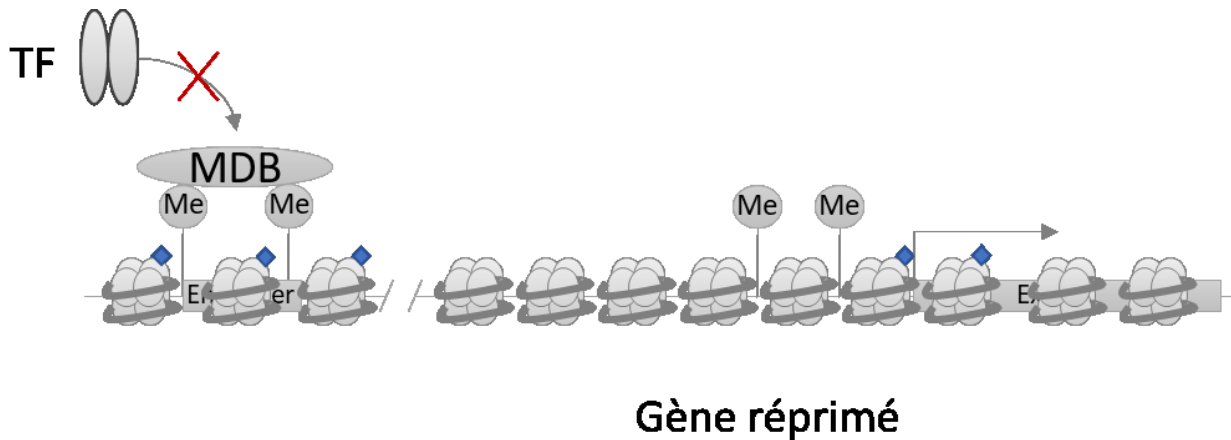


Figure 1.4 : Mécanismes épigénétiques généraux de la répression de la transcription

Cette figure représente les marques épigénétiques généralement liées à la répression de la transcription d'un gène. La méthylation de l'ADN permet la diminution de l'affinité d'un facteur de transcription pour son motif de reconnaissance, ou permet le recrutement de protéines MDB empêchant la liaison des facteurs de transcription pour leur site de liaison. H3K27me3 et H3K9me3 sont particulièrement associées avec la chromatine réprimée : au promoteur pour H3K27me3 et sur de grandes régions autour des promoteurs pour H3K9me3. H3K9me3 est responsable des états plus denses de la chromatine. La présence de ces marques de répression ainsi que l'absence de marques activatrices sont le plus souvent associées avec de l'ADN moins accessible.

1.2.2. L'initiation de la transcription

La transcription chez les eucaryotes se fait grâce à trois ARN polymérases : les ARN polymérases I, II et III. Alors que l'ARN polymérase I permet la transcription des précurseurs des ARN ribosomaux, l'ARN polymérase III transcrit les ARN non-codants comme les ARN de transfert. Les ARN messagers sont eux transcrits par l'ARN polymérase II (ARN-Pol II) qui est responsable de l'expression génique, régulant ainsi des processus comme la différenciation, la maintenance de l'identité cellulaire et la réponse d'une cellule à son environnement. L'ARN-Pol II est un complexe de 12 sous-unités dont le recrutement est finement régulé afin d'éviter la transcription de gènes ou d'ADN non-voulus (figure 1.5 et 1.6). Beaucoup d'études sur l'initiation de la transcription sont faites chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais les parallèles sont nombreux entre les eucaryotes

puisque des facteurs généraux de la transcription comme TBP sont substituables de la levure aux cellules humaines^{97,98}.

L'initiation de la transcription d'un gène est étroitement liée à son promoteur, aux séquences nucléotidiques qui le composent et aux marques épigénétiques associées. Une structure importante est la boîte TATA, composée d'une séquence riche en adénine et thymine, et située environ à 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS)⁹⁹. La séquence canonique de la boîte TATA est TATAWAWR⁹⁹ chez les mammifères bien que la plupart des promoteurs n'en possèdent qu'une variante riche en T et en A^{99,100}. Cette séquence est reconnue avec une très forte affinité par une protéine appelée TBP¹⁰¹ (protéine de liaison à TATA), entourée par les protéines TAFs (facteurs associés à TBP), formant ainsi le complexe TFIID⁹⁸. Ce complexe permet le recrutement de facteurs de transcription généraux TFIIA et TFIIB⁹⁸. TFIIA n'est pas nécessaire pour le reste de l'initiation mais permet une stabilisation de TBP à la chromatine^{98,102}.

TFIIB est recruté aux promoteurs via sa partie N-terminale et permet le recrutement de l'ARN-pol II via sa partie C-terminale formant alors le cœur du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC)^{103,104}. TFIIB stabilise le complexe à l'ADN en interagissant aussi avec des séquences d'ADN situées autour de la boîte TATA et de TBP : les séquences BRE (éléments de reconnaissance B)¹⁰⁵. Ces éléments BRE expliqueraient, du moins en partie l'orientation du PIC puisque le complexe TBP-ADN est plutôt symétrique, permettant ainsi de ne pas déclencher la transcription vers le côté non-désiré. TFIIIF, un autre facteur de transcription général, est associé avec l'ARN-pol II et est recruté au même moment que cette dernière⁹⁸. Il s'agit d'un hétérodimère composé de TFIIIF α et TFIIIF β prévenant les interactions non-spécifiques de l'ARN-Pol II avec l'ADN et stabilisant le PIC^{98,106}.

TFIIIE et TFIIH sont les deux derniers facteurs de transcription généraux nécessaires à l'initiation de la transcription. TFIIIE est un hétérodimère, composé de TFIIIE α et TFIIIE β , se liant à l'ARN-Pol II et permettant le recrutement subséquent de TFIIH faisant ainsi le pont entre les deux complexes^{107,108}. TFIIH est composé de 10 sous-unités toutes essentielles pour l'initiation de la transcription^{109,110}. L'activité de ce complexe est dépendante de l'ATP et possède des activités hélicases 3'-5' et 5'-3' nécessaires à

l'ouverture d'une bulle de transcription et le début de la synthèse d'ARN¹⁰⁹. Trois des sous-unités de TFIIF possèdent une activité kinase phosphorylant la queue N-terminale de l'ARN-Pol II indispensable pour son activité *in vivo*^{109,111}. Le complexe se dissocie ensuite et tous les facteurs d'initiation sont remplacés par des facteurs d'élongation.

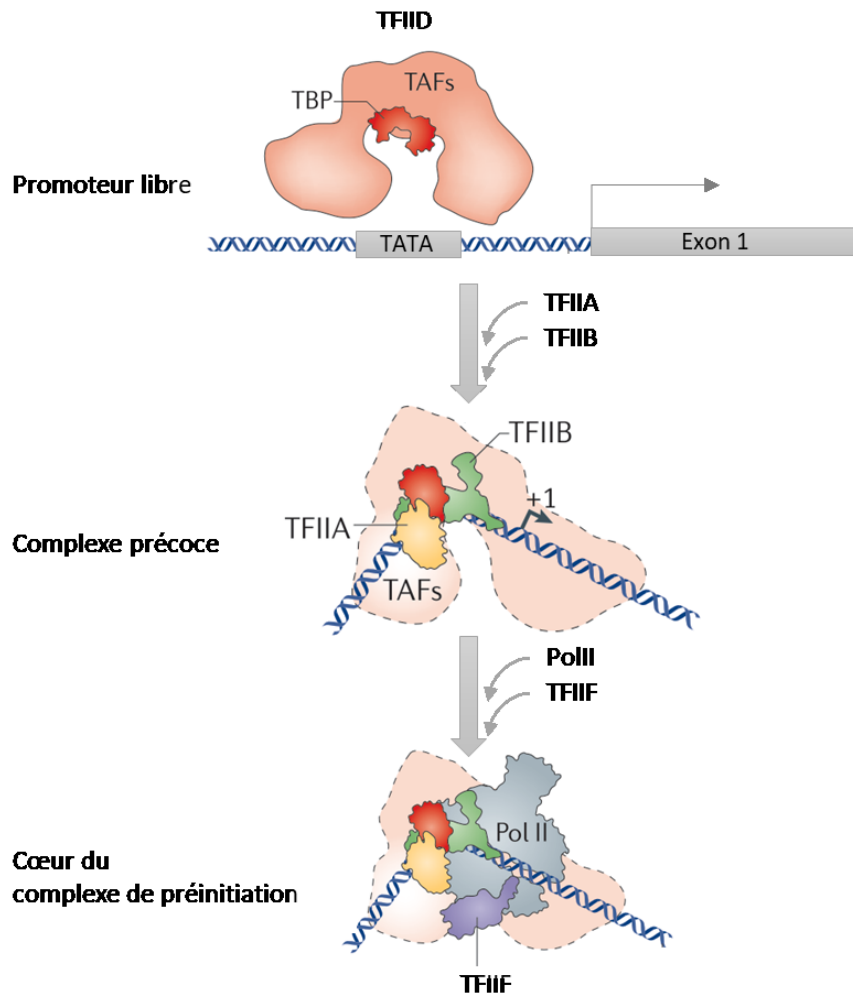


Figure 1.5 : Formation du cœur du complexe de préinitiation (PIC)⁹⁸

Schéma présentant les étapes précoces de l'initiation de la transcription, de la liaison de TBP à la boîte TATA jusqu'au recrutement de l'ARN polymérase II et la formation du cœur du complexe de préinitiation.

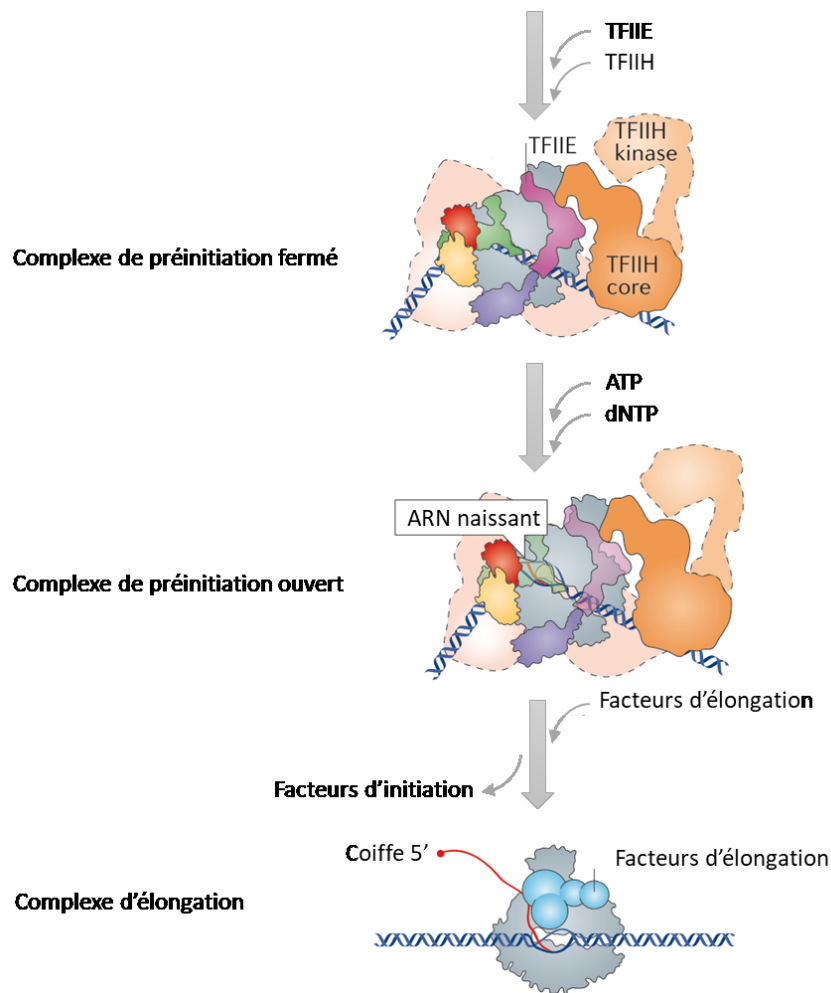


Figure 1.6 : Finalisation de l'initiation de la transcription⁹⁸

Schéma représentant les étapes permettant le début de la transcription à partir du recrutement de l'ARN polymérase II au promoteur, jusqu'au départ des facteurs de transcription généraux, du recrutement des facteurs d'élongation et de la synthèse de l'ARN.

L'initiation est hautement régulée par la chromatine et par l'accessibilité de l'ADN. Les différentes marques épigénétiques présentées dans les paragraphes précédents contrôlent cette accessibilité. Nous allons voir maintenant comment se fait la gestion de ces marques dans la cellule en parlant de facteurs de transcription.

1.2.3. Les facteurs de transcription et enhancers

La modulation de l'initiation de la transcription est un processus important pour l'identité cellulaire et pour la réponse d'une cellule à son environnement^{112,113}. L'identité cellulaire est souvent associée aux régions génomiques actives dans la transcription qui sont le plus ouvertes et disponibles et sont ainsi repérées grâce à leur hypersensibilité à la DNase I (dégradant l'ADN déplété en nucléosomes)^{114,115}. Ces régions sont composées de deux grandes entités : les promoteurs et les enhancers. Les enhancers sont des séquences distales positionnées dans les régions introniques ou intergéniques permettant la régulation de l'activité d'un promoteur par le recrutement de facteurs de transcription nécessaires pour le recrutement et l'activation du PIC¹¹⁵. Les enhancers aident ainsi au recrutement de l'ARN-pol II aux promoteurs mais peuvent aussi attirer de nombreuses enzymes ou coactivateurs permettant la modification de la chromatine (marques d'histones, variants d'histones ou méthylation de l'ADN) et ainsi de la maintenir dans un état actif pour stabiliser le PIC (figure 1.7)^{115,116}.

Comme indiqué plus tôt, les enhancers sont majoritairement spécifiques aux tissus et ce grâce au recrutement précoce de facteurs pionniers spécifiques aux tissus dans la différenciation^{113,117,118}. Les facteurs pionniers sont capables de scanner leur site de liaison dans de la chromatine fermée afin de l'ouvrir et de la rendre accessible à d'autres facteurs¹¹⁷. Ils permettent ainsi le recrutement des facteurs responsables de la mise en place des marques telles que H3K4me1 ou les variants d'histones H2A.Z et H3.3¹¹⁸⁻¹²⁰. La chromatine hautement condensée contenant des marques hautement répressives comme H3K9me3 ou H3K27me3 reste toutefois en partie inaccessible aux facteurs pionniers^{121,122}.

Lors de l'activation d'un enhancer par la liaison d'un facteur de transcription, il y a recrutement de coactivateurs mettant en place les marques d'activation telles que H3K27ac et la transcription bidirectionnelle par l'ARN-pol II de la région menant à la production d'un ARN enhancer^{112,115,123,124}. L'activation d'un enhancer entraîne ensuite la formation d'une boucle permettant un contact physique entre le promoteur et l'enhancer séparés parfois de plusieurs kb à 1 Mb (figure 1.7)¹²⁵. Plusieurs facteurs comme le

complexe médiateur, la cohésine ou encore l'ARN enhancer (ARN produit à partir de l'enhancer) permettent le maintien de ce pont entre les deux régions, la mise en place de marque activatrice (H2A.Z, H3.3 ou H3K27ac) et l'activation de l'ARN-pol II au promoteur, facilitant l'initiation de la transcription¹¹⁵. Chaque facteur de transcription ainsi que chacun des enhancers ont leurs propres spécificités et celles du récepteur aux œstrogènes ERα seront détaillés dans les paragraphes suivants.

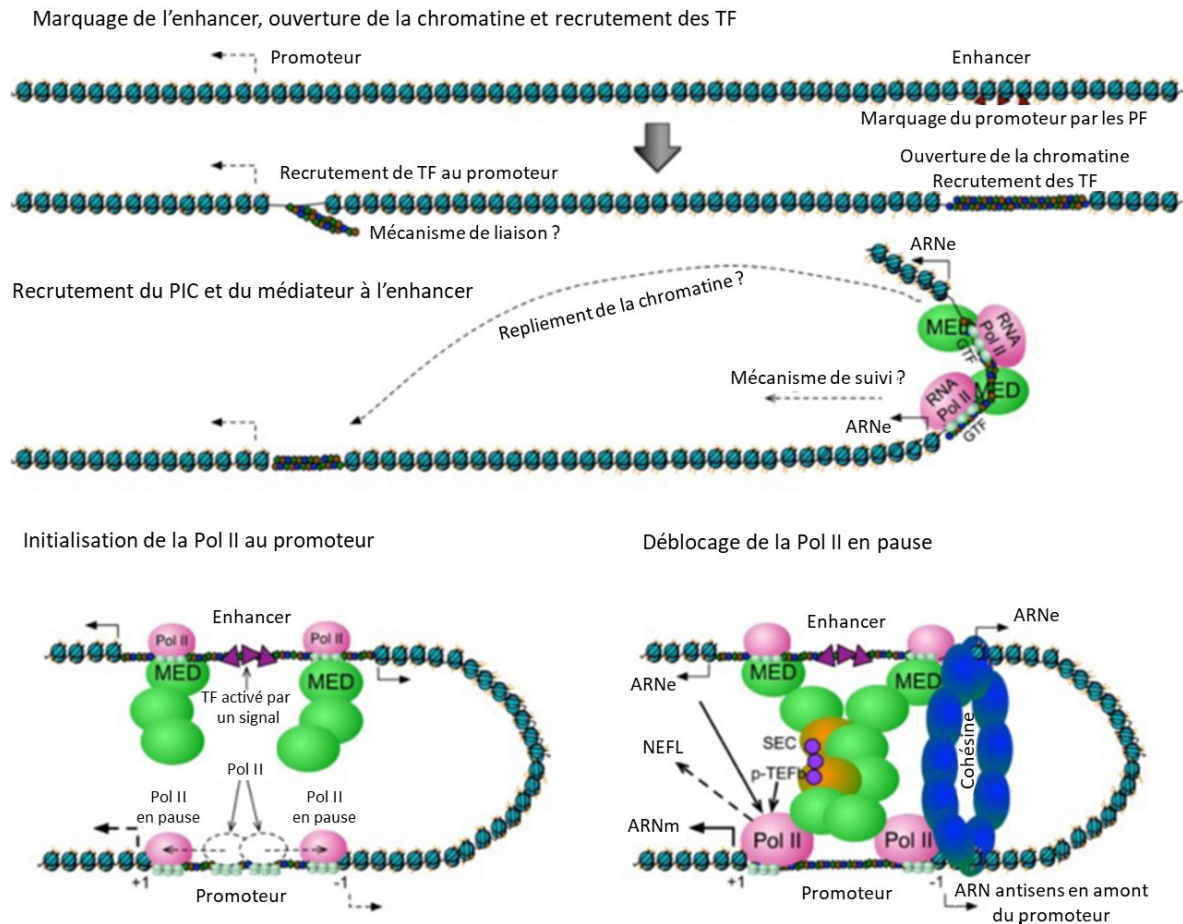


Figure 1.7 : Activation d'un enhancer et collaboration avec le promoteur pour initier la transcription¹¹⁵

Dans les étapes précoces, les enhancers inaccessibles et compactés dans la chromatine sont reconnus par les facteurs pionniers (PF) permettant son marquage (H2A.Z, H3K4me1) par les remodeleurs de la chromatine. Ce marquage crée des régions pauvres en nucléosome autour du promoteur et de l'enhancer permettant le recrutement de facteurs de transcription (TF). Les TF servent ensuite de plateforme pour le recrutement du PIC et du complexe médiateur, induisant ainsi la transcription bidirectionnelle de l'enhancer. Une boucle se forme alors facilitant alors le contact entre l'enhancer et le promoteur. Sans activation de l'enhancer, la Pol II est recrutée au promoteur et initie la

transcription jusqu'à se mettre en pause aux deux extrémités de la région déplétée en nucléosome autour du promoteur. L'activation de l'enhancer par un signal activant un TF (exemple ER α) permet le recrutement de la cohésine pour stabiliser la structure en boucle de l'ADN mais aussi le recrutement de coactivateur et de facteur d'élongation phosphorylant la queue C-terminale de la Pol II permettant de débloquer la pause et de passer dans la phase d'élongation de la transcription.

1.3. Le récepteur aux œstrogènes ER α

Le récepteur aux œstrogènes ER α est particulièrement étudié pour son rôle dans le développement de la majorité des cancers du sein. ER α est un récepteur nucléaire et plus particulièrement un récepteur aux hormones stéroïdiennes, dont l'activation par les œstrogènes permet la modulation de gènes clés intervenant dans le cycle cellulaire notamment. Cette partie se concentrera sur les généralités concernant les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, sur les particularités concernant ER α et enfin sur les modes d'action et les fonctions de ER α dans les cellules cancéreuses et saines.

1.3.1. Généralités sur les récepteurs aux stéroïdes (SRs)

La famille des récepteurs aux stéroïdes (SRs) est composée de gènes dérivés d'un gène ancestral nommé *ancSR1* (figure 1.8)^{6,126}. Elle est composée de quatre récepteurs aux hormones sexuelles (les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β , le récepteur aux androgènes AR et le récepteur à la progestérone PR) et des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes (GR et MR). Ils possèdent tous la structure classique d'un récepteur nucléaire avec deux domaines de transactivation (AF1 et AF2), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD dans le domaine AF2) et enfin une région charnière entre les domaines DBD et AF2¹²⁷.

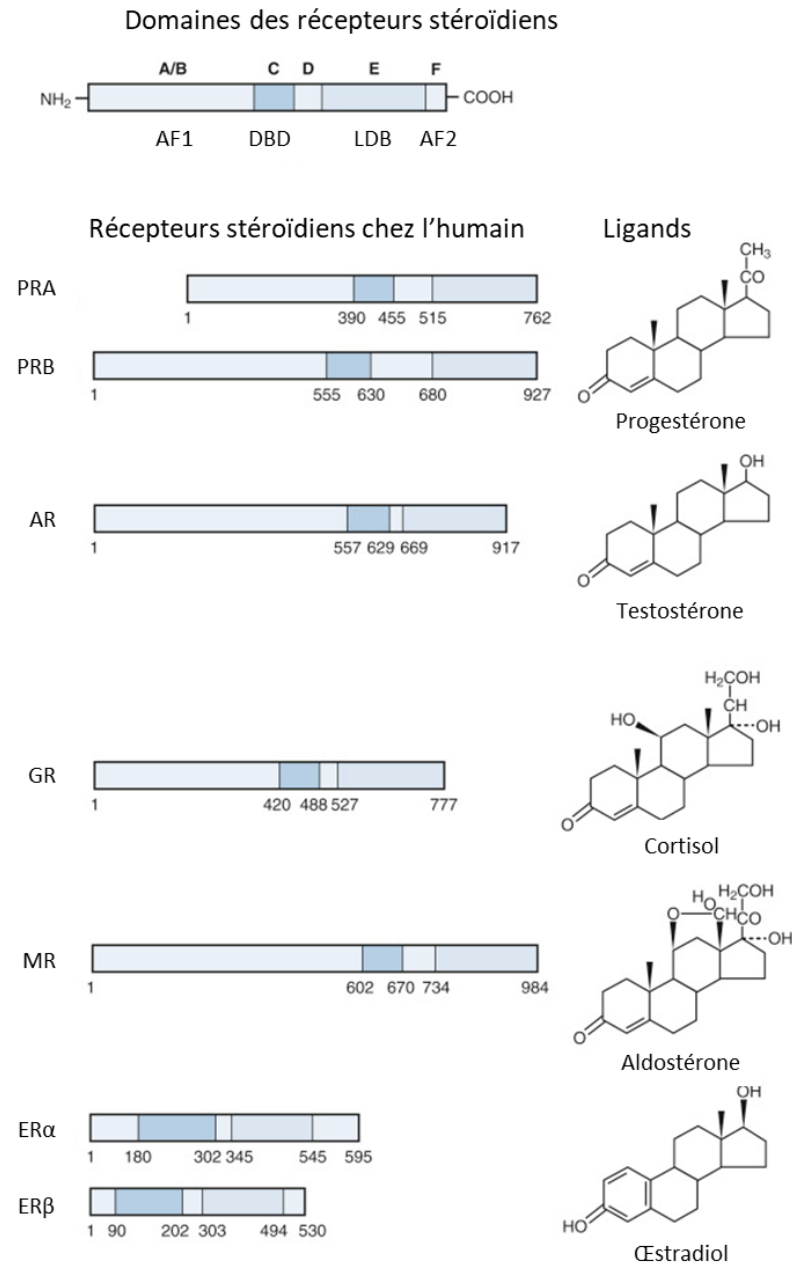


Figure 1.8 : La famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes¹²⁷

La structure classique des récepteurs aux hormones stéroïdiennes avec des domaines AF1, DBD, LBD et AF2. La liaison du ligand aux domaines LBD ou la phosphorylation du domaine AF1 sont connues pour entraîner la dimérisation et l'activation des récepteurs. De manière intéressante, ces récepteurs possèdent de nombreuses isoformes dues à l'épissage alternatif, donnant lieu à des pertes de certains domaines ou fragments de domaine menant alors à des fonctions différentes.

Classiquement, ces récepteurs sont localisés dans le cytoplasme de la cellule, et sont liés avec des protéines chaperonnes HSP telle que HSP90¹²⁸. Ces chaperonnes permettent le bon repliement des récepteurs aux stéroïdes à la sortie du ribosome, mais inhibent aussi leur activité en les séquestrant hors du noyau¹²⁸. Le LBD est la région qui permet la liaison avec l'hormone stéroïdienne, et cette liaison permet un changement de conformation du récepteur, le libérant de ses chaperonnes et induisant sa translocation au noyau¹²⁸. Cependant, le récepteur aux œstrogènes ER α peut être localisé au noyau en l'absence de son ligand¹²⁸. Le changement de conformation du récepteur dû à la liaison du ligand permet aussi la dimérisation et le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs au niveau des domaines AF1 et AF2^{127,128}. Les récepteurs ainsi activés peuvent se fixer à des enhancers disponibles (marqués H3K4me1) directement au niveau de séquences de liaison spécifique ou via un autre facteur de transcription (généralement AP1 ou SP1)^{128–130}. Les coactivateurs ou corépresseurs recrutés au niveau de l'enhancer par le SR permettent alors l'activation ou la répression de l'initiation de la transcription au niveau du promoteur associé. Il s'agit ici d'une voie classique, mais ER α comme les autres SR possèdent des spécificités ainsi que des voies non classiques d'activation qui seront plus particulièrement décrites dans le paragraphe suivant.

1.3.2. Activation et mode d'action de ER α

Comme le reste des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, ER α transloque du cytoplasme au noyau après sa fixation avec un œstrogène (principalement E2) et sa dissociation avec la protéine HSP90 et peut ainsi moduler l'expression de ses gènes cibles^{128,131–133}. Certaines études montrent aussi que ER α peut être présent au noyau avant son activation¹³³. Il s'agit de la voie classique de l'activation de ER α et elle sera détaillée dans cette partie, mais ce n'est pas la seule existante. En effet, au fil des années, des études ont démontré l'importance de voies alternatives d'activation sans liaison au ligand ou de modes d'action non-classiques de ER α ne le faisant pas intervenir directement à la chromatine et dans l'expression des gènes (figure 1.9).

1.3.2.1. Activation classique de ER α

De nombreuses études concernant ER α sont effectuées sur des lignées cellulaires issues de cancer du sein, en particulier la lignée MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7). Cette lignée est importante dans la compréhension de ER α et dans son rôle dans la régulation de la transcription et une part importante des données présentées dans ce chapitre seront issues d'études utilisant des MCF7. Il faut néanmoins faire attention à ne pas trop généraliser ces résultats, puisqu'en effet, comme mentionné plus tôt, chaque tissu possède ses propres enhancers, ses propres coactivateurs et ses propres corépresseurs et donc sa propre voie d'activation de ER α . Chaque tissu est ainsi assez unique dans sa manière de réguler la transcription de ses gènes et de grandes spécificités tissulaires peuvent exister en particulier entre des tissus sains et des lignées cellulaires dont la survie est dépendante de ER α .

De manière typique, ER α est guidé à la chromatine grâce à de multiples facteurs décrits précédemment : l'ouverture de la chromatine, la présence de marques d'histones enhancer (H3K4me1) et la présence d'un site de liaison du récepteur au niveau de l'ADN (élément de réponse aux œstrogènes ou ERE)^{134,135}. La chromatine est préalablement ouverte pour accueillir ER α par les facteurs pionniers, et dans les MCF7, c'est le FOXA1¹³⁶ qui y contribue le plus souvent bien que des facteurs comme PBX1¹³⁷, TLE1¹³⁸, AP2 γ ¹³⁹ et GATA3¹⁴⁰ ont aussi été décrits. FOXA1 est un membre de la famille des facteurs de transcription "*forkhead*" et est souvent coexprimé avec ER α dans les modèles cellulaires de cancers du sein et dans les tumeurs primaires mammaires où il agit en tant que facteur pionnier de ER α ^{136,141}. La proportion des sites de liaison de ER α liés par des facteurs pionniers avant un traitement aux œstrogènes est d'environ 80% montrant que la chromatine est prête à répondre à son environnement avant toute stimulation^{140,141}. Sans surprise, une perte des facteurs pionniers dans les modèles de cancers du sein rend la chromatine plus compacte et influence directement le recrutement de ER α à ses sites de liaison, affectant directement la prolifération induite par ER α ^{137,140}. ER α est aussi capable de se fixer à l'ADN de manière indirecte via d'autres facteurs de transcription dont les plus étudiés sont AP1 et SP1^{142,143}. Même si le recrutement de ER α est indirect, le

mode d'activation de la transcription demeure sensiblement le même : par le recrutement de coactivateurs (principalement des HATs).

Bien que la marque H3K4me1 soit présente avant le recrutement de ER α à ses sites de liaison, la fixation de ER α entraîne d'autres modifications épigénétiques synonymes d'activation de l'enhancer. Comme mentionné précédemment, la fixation d'un facteur de transcription à son enhancer induit le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs. Pour ER α , un des coactivateurs majeur permettant la signalisation de ER α est l'histone acétyltransférase (HAT) p300¹⁴⁴. CBP est une autre HAT aussi connue pour être recrutée avec ER α , potentialisant ainsi la signalisation de ER α ¹⁴⁵. Ensemble, ces deux HAT sont responsables de l'acétylation de multiples lysines comme H3K27, H3K18 ou encore H4K12 associées à des enhancers proches de gènes activement transcrits¹⁴⁶. CARM1 est une histone méthyltransférase (HMT) responsable de la marque H3R17me2 retrouvée à de nombreux enhancers actifs de ER α après une stimulation aux œstrogènes, et associée avec un recrutement plus important de l'ARN-pol II^{147,148}. La citrullination des arginines est une autre marque épigénétique associée avec l'activation des enhancers. Une stimulation aux œstrogènes induit la marque H3R26cit aux sites de liaison de ER α et une perte de fonction de la protéine PAD2, responsable de la marque H3R26cit, induit une perte de liaison de ER α et une diminution de la transcription de ses gènes cibles¹⁴⁹. Le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, capable de perturber la liaison entre les nucléosome et l'ADN, est aussi recruté aux sites de liaison de ER α permettant une accessibilité accrue de l'ADN à ces régions¹³⁵. Le recrutement de ER α à la chromatine suit un mécanisme dynamique et cyclique même en cas de stimulation aux œstrogènes constante¹³⁵. De manière intéressante, les marques de la chromatine, les coactivateurs et les remodeleurs de la chromatine recrutés par ER α suivent le même modèle cyclique¹³⁵. L'activation de la transcription par ER α et ses enhancers suit ainsi des cycles qui ne sont pas encore bien compris à ce jour.

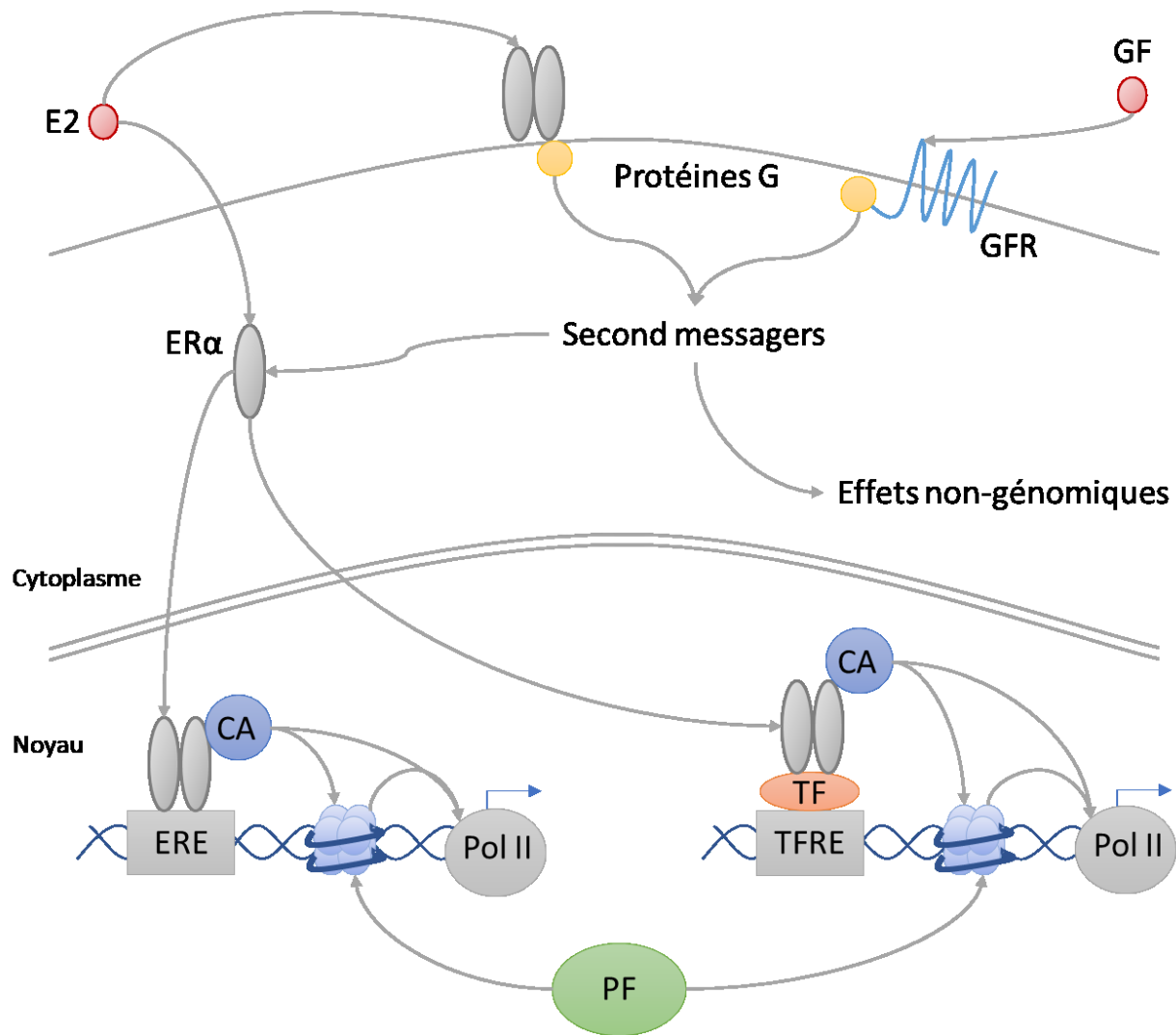


Figure 1.9 : Modes d'action de ERα

La voie classique d'activation d'ERα se définit par sa dissociation de HSP90, sa dimérisation et par sa translocation du cytoplasme au noyau après une stimulation par les œstrogènes. ERα peut ainsi, grâce à un changement de conformation se fixer à la chromatine directement via ses motifs de liaison ERE ou indirectement via d'autre TF (AP1) découvert grâce aux facteurs pionnier (FOXA1). La fixation de ERα à la chromatine permet ainsi le recrutement de cofacteurs, en majorité des HAT (p300/CBP), mais aussi des HMT et des remodeleurs de la chromatine permettant la mise en place de marques épigénétiques synonymes d'activation autour des enhancers et promoteurs cibles de ERα. Ces marques d'activation permettent l'activation et la stabilisation du PIC et facilitent la transcription du gène cible. Il existe aussi des voies non-classiques d'activation de ERα par phosphorylation du domaine AF-1 du récepteur par l'activation de la voie des MAPK en réponse à une stimulation par EGF par exemple. Cette phosphorylation permet l'activation du récepteur mais aussi la potentialisation de son activation par liaison à son ligand. ERα peut aussi être localisé à la membrane plasmique et permettre l'activation de voies de signalisation dépendantes des protéine G. L'activation de ces voies de

signalisation permet d'entraîner des effets non-génomiques rapides dans le cytoplasme, non-dépendants de la transcription. Des effets génomiques de l'activation des voies de signalisation dépendantes des protéines G sont aussi observés par l'amplification de l'activation du ER α nucléaire via la voie des MAPK par exemple.

1.3.2.2. Rôles non-génomiques de ER α

L'action de ER α dans une cellule ne se limite pas à une régulation de l'expression des gènes, de nombreuses actions non-génomiques avec ER α localisé hors du noyau ont été décrites au cours des dernières années. En effet, la présence de ER α à la membrane plasmique est un phénomène qui a été identifié très tôt^{150,151}. De plus, un site de palmitoylation à la cystéine 447 (dans le domaine AF2)¹⁵²⁻¹⁵⁴, servant à l'ancrage à la membrane plasmique, ainsi qu'une association avec une protéine membranaire, la cavéoline 1, ont été identifiés¹⁵². La palmitoylation est effectuée par deux palmitoyl acyltransférase (PAT) ZDHHC7 et ZDHHC21 et nécessite l'intervention de la chaperonne HSP27¹⁵⁵. La dimérisation du récepteur est induite par la liaison des œstrogènes au LBD que ce soit au niveau nucléaire ou membranaire¹⁵⁶. De manière générale, ER α membranaire peut s'associer et activer des protéines G comme un RCPG (récepteur couplé à une protéine G) et permet ainsi d'initier de multiples voies de signalisation par l'activation des adénylates cyclases, des guanylates cyclases ou des phospholipases c, en fonction du type cellulaire ou du modèle étudié^{157,158}. Cela peut mener à une production de seconds messagers tels que l'AMPc, le GMPc, le DAG et IP3, les deux derniers contribuant à une hausse du flux d'ions calcium dans la cellule permettant l'activation des voies de signalisation associées. La conséquence d'une telle signalisation est qu'une exposition prolongée aux œstrogènes permet la phosphorylation des récepteurs au facteur de croissance "*insulin-like*" (IGF1R) et au facteur de croissance épidermal (EGFR), en particulier dans les cancers du sein et de la prostate^{158,159}. La phosphorylation de ces récepteurs permet l'activation des cascades de signalisation des MEK/ERK et des PI3K/AKT participant à la réponse proliférative et invasive aux œstrogènes.

1.3.2.3. Activation non-classique de ER α

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle souvent utilisée par les cellules dans les voies de signalisation afin d'activer ou d'inhiber la fonctionnalité d'une protéine. Quatorze résidus de ER α ont été identifiés comme pouvant être phosphorylés et pour neuf d'entre eux un rôle dans l'activité du récepteur a été démontré¹⁶⁰. La majorité de ces sites se retrouve dans le domaine AF1 de ER α et peut être phosphorylé par des kinases issues de nombreuses voies de signalisation en fonction du type cellulaire : MAPK (mitogen activated protein kinase)¹⁶¹, CK2 (caséine kinase 2)¹⁶², PKA (protéine kinase A)¹⁶³, PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase)¹⁶⁴, CDK2/cycline A (kinase dépendante des cyclines 2)¹⁶⁵, GSK3 (kinase synthase de glycogène 3)¹⁶⁶, CDK7¹⁶⁷ ou IKK α (inhibiteur de la kinase kappa α)¹⁶⁸, plaçant ainsi ER α au carrefour de multiples voies de signalisation. Parmi tous les résidus phosphorylables, deux sont particulièrement étudiés : la Ser118 et la Ser167 retrouvées toutes deux dans le domaine AF1 de ER α humain.

La Ser118 peut être phosphorylée par les nombreuses kinases nommées dans le paragraphe précédent. Plus précisément, les MAPK ERK1/2 et CDK7 ont été identifiées comme phosphorylant ER α au niveau de la Ser118 après une stimulation aux œstrogènes ou par EGF respectivement^{167,169}. EGF est ainsi capable d'activer ER α en l'absence d'œstrogènes¹⁷⁰. La phosphorylation de la Ser118 affecte positivement l'interaction entre ER α et certains de ses coactivateurs comme les HAT p300, CBP et p160. De plus, une activation continue de la voie des MAPK, via la phosphorylation de la Ser118, permet de contourner la signalisation dépendante du ligand de ER α rendant par exemple les tumeurs indépendantes aux hormones mais plus sensibles aux anti-œstrogènes comme le tamoxifène, un antagoniste de ER α dans le cancer du sein^{168,171–173}.

La Ser167 est un second résidu très étudié pour l'impact de sa phosphorylation sur l'activité de ER α . De nombreuses kinases, dont AKT et CK2 particulièrement, affectent la phosphorylation de ce résidu dans les cancers du sein. Par exemple, la phosphorylation par CK2 augmente l'affinité de ER α pour les séquences ERE et ainsi sa liaison à la chromatine^{174,175}. La phosphorylation de la Ser167 augmente aussi la liaison de SRC3

(coactivateur de récepteur stéroïdien 3), une HAT et coactivateur de ER α , permettant l'augmentation de l'expression des gènes cibles de ER α ^{176,177}. AKT a aussi été associé avec la phosphorylation de la Ser167 de ER α et dans la sensibilité au tamoxifène, qui est diminuée après une augmentation, amenant à une corrélation négative entre les deux variables¹⁷⁷.

Les multiples voies d'activation et d'action de ER α font de la réponse aux œstrogènes un mécanisme complexe qui est dépendant du tissu étudié. La complexité ne s'arrête pas à ce point, puisque les œstrogènes possèdent en plus deux autres récepteurs nommés ER β et GPER. ER β sera discuté plus en détail dans le paragraphe suivant et nous reviendrons sur les deux récepteurs dans les paragraphes concernant les effets des œstrogènes sur le métabolisme énergétique et en particulier le tissu adipeux blanc.

1.3.2.4. Le récepteur aux œstrogènes ER β

ER β est un second récepteur nucléaire répondant aux œstrogènes, qui est encodé dans le gène *Esr2*¹⁷⁸. La majorité des études concernant le mode d'action de ER β est faite sur la lignée MCF7¹⁷⁹ et T47D¹⁸⁰ surexprimant artificiellement ER β , puisqu'aucune lignée cellulaire de cancer du sein, y compris celles qui expriment ER α n'expriment pas ER β . Les sites de liaison de ER β à la chromatine sont en partie communs avec ER α dans les MCF7 bien que des spécificités existent dans le contexte génomique : les motifs ERE riches en GC sont abondants par exemple dans les sites de liaison de ER β ¹⁸¹. ER β influence aussi la fixation de ER α , puisque le cistrome de ER α est légèrement différent en présence et en l'absence de ER β ¹⁸¹. Bien que les deux récepteurs puissent collaborer et se dimériser, le rôle de ER β est aussi en partie antagoniste à celui de ER α , en particulier sur la croissance et la prolifération^{179,180,182}. Ce résultat est reproductible autant dans les cellules MCF7 que T47D ce qui expliquerait l'absence d'expression de ER β dans les lignées de cancer du sein. Pour le moment, les acteurs moléculaires de l'effet antiproliférique de ER β ne sont pas connus. Ce qui est connu est que ER β , par sa stimulation via un agoniste spécifique serait capable d'entraîner la dégradation de ER α ¹⁸³. ER β peut aussi avoir un impact positif sur la voie du TGF β qui est antiproliférative dans

les MCF7, contrecarrant ainsi les effets de ER α sur cette voie¹⁷⁹. L'expression de ER β dans les cancers du sein est généralement associée positivement à un bon pronostic mais peu de chose sont connues sur le complexe de corégulateurs associés à ER β ainsi que les modifications épigénétiques liées à son activation¹⁸⁴.

1.3.2.5. Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERM)

Composant	Ki (nM)		GPER ¹⁸⁸
	ER α ¹²	ER β ¹²	
E2	0,13	0,12	3-6 nM
Diéthylstilbestrol	0,04	0,05	>1 μ M
Estrone	0,3	0,4	>10 μ M
Estriol	1,4	0,7	>1 μ M
4-OH-Tamoxifène	0,1	0,04	0.1-1 μ M
Tamoxifène	3,4	2,5	
ICI	0,2	0,08	1 μ M
Coumestrol	0,14	0,07	
Génistéine	2,6	0,3	133 nM
Bisphénol A	195	35	0.6 μ M
5-Androsténédior	3,6	0,9	
5 α -dihydrotestostérone	221	73	

Tableau 1.2 : Affinité des SERM les plus courants pour ER α , ER β et GPER^{12,188}

Les SERM ont des affinités différentes pour les trois récepteurs aux œstrogènes induisant ainsi potentiellement une réponse différente entre les tissus en fonction de l'expression relative de ces récepteurs. L'E2, l'estrone, ou l'estriol sont des hormones naturelles dérivées du cholestérol permettant l'activation des récepteurs aux œstrogènes. Les SERM sont aussi des molécules de synthèse comme le tamoxifène mais aussi des molécules issues des plantes appelées phyto-œstrogènes comme la génistéine.

Les SERM sont des molécules capables d'activer ou d'inhiber les fonctions des récepteurs aux œstrogènes (tableau 1.2). Les œstrogènes sont agonistes purs des récepteurs aux œstrogènes dans tous les modèles étudiés, cependant, les SERM peuvent être agonistes ou antagonistes selon les conditions et le tissu¹⁸⁵. Le tamoxifène en est un exemple : il est utilisé comme traitement contre le cancer du sein puisqu'il est antagoniste de ER α dans le tissu mammaire¹⁸⁶. En revanche, il a été démontré qu'il est agoniste de ER α dans les cellules osseuses ou l'endomètre¹⁸⁶. Ce phénomène est peu

étudié et est supposé être multifactoriel : les isoformes de ER α exprimés, la balance entre les expressions de ER α et ER β ¹² et/ou un changement de conformation du récepteur différent (recrutant des cofacteurs différents)¹⁸⁷ sont autant de pistes supposées de ce phénomène. Les SERM sont très utiles pour décortiquer les effets de chacun des récepteurs aux œstrogènes puisque certains sont spécifiques à ER α , ER β ou à GPER^{12,188}. Les plus utilisés sont le PPT, agoniste spécifique de ER α (bien que aussi agoniste de GPER), le DPN, agoniste spécifique de ER β et G1, agoniste spécifique de GPER¹⁸⁸.

1.4. Les fonctions du métabolisme énergétique

Comme mentionné précédemment, les récepteurs nucléaires exprimés par la souris et l'humain dérivent tous d'un récepteur ancestral commun : ancSR. L'apparition du récepteur aux stéroïdes ancestral est antérieure à l'apparition des enzymes de la stéroïdogenèse et donc de l'apparition des hormones sexuelles, suggérant que ancSR n'était pas un récepteur impliqué dans la reproduction. Des prédictions à partir des données phylogénétiques sur les récepteurs aux hormones stéroïdiennes ont permis d'identifier la séquence probable de ancSR et il a été déterminé qu'il avait une bonne affinité avec l'E2 et peut être recruté au niveau des séquences ERE. De manière intéressante, ER α et ER β sont les récepteurs aux hormones stéroïdiennes qui ont le moins évolués à partir de ancSR et les acides aminés clés dans la reconnaissance du ligand sont très conservés entre ancSR et les ERs par rapport aux autres récepteurs de la même famille. Il est supposé que le système hormonal mis en place chez les vertébrés utilisant les stéroïdes est une adaptation d'un système plus ancien de détection de l'environnement par ancSR servant au contrôle du métabolisme énergétique ainsi que de la reproduction. Cela permet l'introduction à ces deux dernières parties traitant de l'effet des œstrogènes sur le métabolisme énergétique, mais aussi ouvre une pensée sur la sensibilité encore très présente de ER α à son environnement et en particulier aux pesticides et aux phyto-œstrogènes.

1.4.1. L'adipogenèse

Les adipocytes sont classés en trois grandes catégories qui sont les adipocytes blancs, bruns ou beiges (figure 1.10). Les adipocytes blancs sont composés majoritairement d'une gouttelette lipidique qui prend presque entièrement tout le cytoplasme, et ne possèdent que très peu de mitochondries. Inversement, les adipocytes bruns et beiges sont très similaires et possèdent de nombreuses petites gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries spécialisées exprimant une protéine avec une importance majeure dans le métabolisme énergétique : UCP1 (protéine de découplage 1). Comme son nom l'indique, UCP1 permet de découpler la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries induisant une production de chaleur à la place de l'ATP¹⁸⁹. La conséquence est majeure puisque la chaîne n'est plus inhibée par l'ATP permettant une utilisation massive des réserves lipidiques. Les différents types d'adipocytes dérivent de deux types de précurseurs adipocytaires : les cellules souches mésenchymateuses MYF5⁻ pour les adipocytes blancs et beiges¹⁹⁰, et MYF5⁺ pour les adipocytes bruns (lignée commune avec les myocytes)^{191,192}. Néanmoins, l'ablation du gène PTEN, favorisant la différenciation dans la lignée MYF5⁺ (grâce à une cre-recombinase dépendante du promoteur de MYF5) montre une augmentation de la taille des dépôts de BAT (tissu adipeux brun), mais aussi de certains dépôts de WAT, supposant ainsi qu'une partie au moins des adipocytes blancs proviennent des lignées de précurseurs MYF5⁺¹⁹³.

Les facteurs de transcription sont la clé de la différenciation en l'une ou l'autre lignée. PPAR γ et les trois membres de la famille C/EBP (protéine de liaison aux enhanceurs CCAAT) coopèrent ensemble et ont des rôles dans les adipocytes blancs et bruns, maintenant une différenciation stable des adipocytes^{194,195}. Pour aller dans l'une ou l'autre des voies, d'autres facteurs de transcription ou cofacteurs sont impliqués. Ainsi, le corépresseur RIP140¹⁹⁶ et le coactivateur TIF2¹⁹⁷ sont connus pour la différenciation en adipocytes blancs alors que les facteurs de transcription PPAR α ^{198,199}, FOXC2²⁰⁰ ainsi que les coactivateurs PGC1 α ^{201,202}, SRC1¹⁹⁷ et PRDM16¹⁹¹ favorisent la différenciation en adipocytes bruns^{203,204}. La différenciation en adipocytes matures se traduit par

l'expression de marqueurs spécifiques comme la leptine ou la résistine pour les adipocytes blancs ou UCP1 dans les adipocytes bruns²⁰⁵.

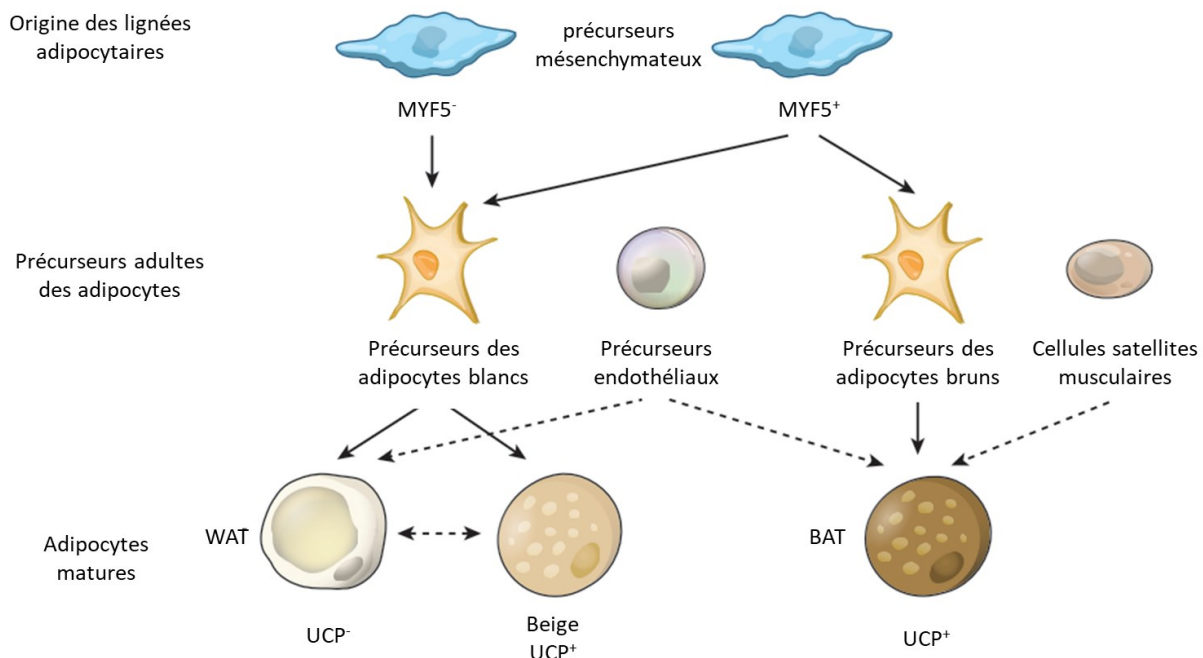


Figure 1.10 : Les différentes voies de différenciation des adipocytes²⁰⁴

Les adipocytes matures proviennent de deux lignées différentes, les blancs et beiges de cellules mésenchymateuses MYF5⁻ et les bruns d'une lignée MYF5⁺ commune avec les myocytes. Les précurseurs adultes des adipocytes blancs proviennent majoritairement de la lignée mésenchymateuse MYF5⁻ bien que certains peuvent provenir de la lignée MYF5⁺. Les précurseurs des adipocytes blancs sont les mêmes que ceux des adipocytes beiges et il existe une voie de transdifférenciation entre ces deux types d'adipocytes. Les adipocytes bruns dérivent des précurseurs MYF5⁺ bien que les adipocytes bruns puissent provenir de cellules plus différenciées telles que les cellules satellites musculaires ou les précurseurs endothéliaux.

Il existe une voie de transdifférenciation permettant à certains adipocytes blancs de devenir beiges et vice-versa^{206,207}. Cette voie permet d'éliminer les réserves lipidiques contenues dans les adipocytes blancs en cas d'exposition au froid²⁰⁷ par l'expression de facteurs thermogéniques comme UCP1. Cette transdifférenciation peut être aussi activée par une stimulation des adipocytes par les catécholamines²⁰⁸. Les mécanismes de la transdifférenciation d'adipocytes blancs en beiges impliquent l'activation de C/EBPα

associé à des corégulateurs comme PRDM16, CtBP1 et CtBP2 d'un côté pour inhiber les gènes spécifiques au WAT^{209,210} et PPAR γ associé à PRDM16 et PGC1 α pour activer l'expression des gènes spécifiques à la lignée adipocytaire beige^{211,212}. De plus, la voie des kinases JAK semble impliquer dans la maintenance en adipocytes blancs puisqu'une inhibition de la voie entraîne une transdifférenciation dans les adipocytes humains²¹³. L'inverse met en jeu différents facteurs de transcription comme le récepteur aux glucocorticoïdes et ses effecteurs ZFP423 et RREB1²⁰⁵. Ensemble, ces facteurs permettent un retour vers un adipocyte blanc, arrêtant ainsi le découplage de la chaîne de transport des électrons et la production de chaleur lorsque l'exposition au froid est terminée.

1.4.2. La voie de l'insuline

L'insuline et les voies de signalisation associées sont particulièrement importantes dans le métabolisme énergétique et en particulier dans l'absorption, le stockage et de manière générale le métabolisme du glucose. L'insuline agit via un récepteur membranaire hétérotétramère (deux sous-unités α et deux sous-unités β) à activité tyrosine kinase et l'effecteur principal de la voie de signalisation est la protéine AKT (figure 1.11)²¹⁴. Lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, son activité tyrosine kinase est activée et le signal est propagé dans la cellule par autophosphorylation en particulier sur la tyrosine 960²¹⁵. Cette phosphorylation permet d'attirer des protéines contenant des domaines SH2 (src homology 2), SH3 ou PTB (phosphotyrosine binding) en particulier celle de la famille IRS (substrat du récepteur à l'insuline)^{214,216}. La majorité des effets de l'insuline passe par IRS1 ou IRS2, des protéines échafauds permettant le recrutement des effecteurs de la voie de l'insuline et constituant le nœud 1 de la signalisation de l'insuline²¹⁷. Deux voies de signalisation divergent à cette étape : la voie de PI3K/AKT^{214,218,219} d'une part et la voie des MAPK/ERK^{214,220,221} de l'autre.

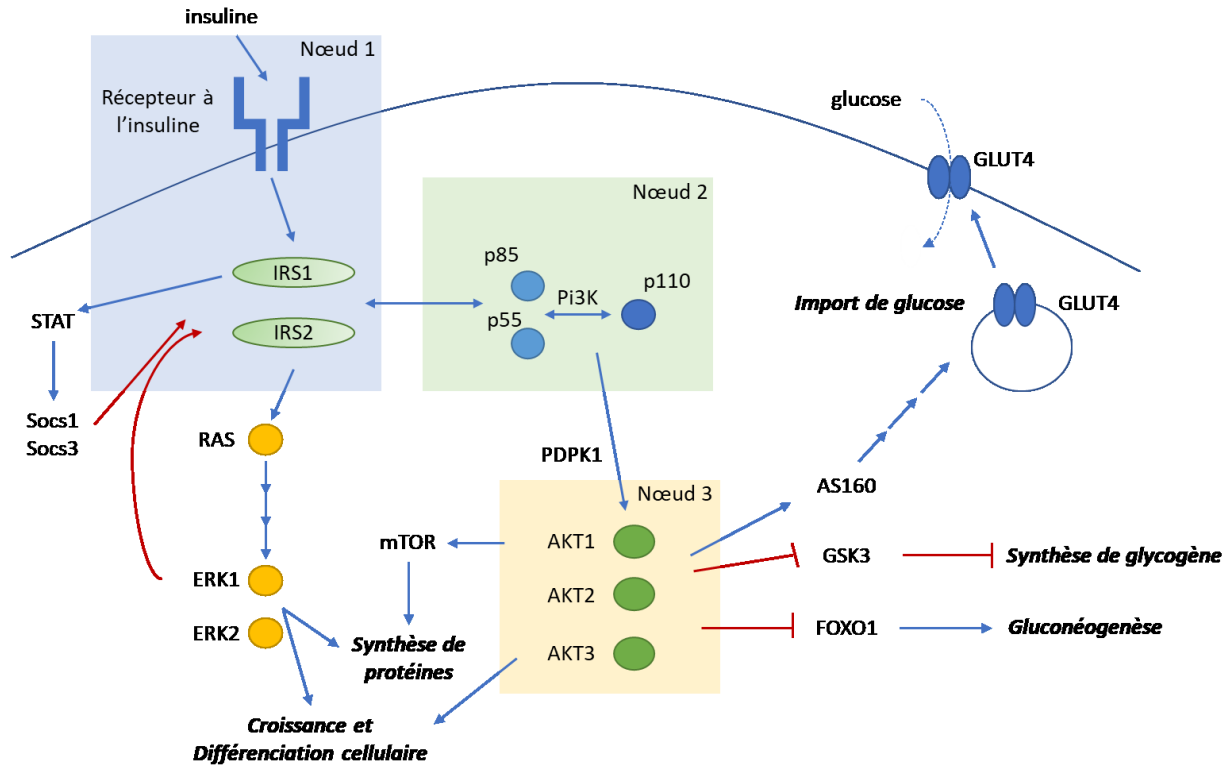


Figure 1.11 : Schéma général de la voie de l'insuline²¹⁴

La liaison de l'insuline à son récepteur active sa fonction tyrosine kinase. L'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline induit son autophosphorylation pour amplifier son signal ainsi que la phosphorylation de ses substrats : les protéines IRS. Ces premières étapes constituent le 1^{er} nœud de la voie de l'insuline. Les protéines IRS sont des échafauds permettant le recrutement des effecteurs de la voie tels que les sous-unités régulatrices p85 et p55 de la PI3K induisant à leur tour le recrutement de la sous-unité catalytique p110 : cette dernière étape constitue un 2^{ème} nœud de la signalisation de l'insuline. La PI3K permet d'augmenter la concentration locale en PiP3, un second messenger activant la PDK1 qui par phosphorylation entraîne l'activation des protéines AKT. Les protéines AKT affectent l'activité de nombreux effecteurs de la voie de l'insuline : AS160, GSK3, FOXO1 ou mTOR potentialisant ainsi l'import du glucose et son stockage. La voie de l'insuline active aussi des voies de rétrocontrôle négatif par activation de la voie des kinase ERK ou JAK/STAT par exemple, permettant ainsi l'extinction du signal de l'insuline.

Le nœud 2 de la signalisation de l'insuline est caractérisé par le recrutement de la PI3K au niveau des IRS. La voie de la PI3K/AKT est déclenchée via la liaison à IRS1 ou IRS2 de p85 et p55, des sous-unités adaptatrices de PI3K, permettant ainsi l'activation de sa sous-unité catalytique p110, elle aussi recrutée par les protéines IRS^{214,217}. PI3K active

peut alors générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) amenant ainsi à l'activation des trois isoformes de AKT par les PDK-1 et -2 (protéine kinase dépendante des phosphoinositides) formant ainsi le nœud 3 de la signalisation de l'insuline^{214,217,222}. Quatre substrats des AKT sont particulièrement importants dans la réponse à l'insuline : AS160 (substrat de AKT de 160 kDa)^{223,224}, mTOR^{225,226}, GSK3 (kinase synthase de glycogène 3)²²⁷ et FoxO1^{228–231}. AS160 est une protéine activatrice de GTPase (GAP) qui stimule l'activité GTPasique de Rab et qui a un rôle majeur dans la voie de l'insuline puisqu'il est impliqué dans le transport vésiculaire et l'import du glucose. Lorsque Rab est couplé au GDP plutôt qu'au GTP, il n'est pas en mesure d'assurer ses fonctions dans le trafic vésiculaire. Une fois phosphorylé par Akt, AS160 perd son activité GAP, ce qui l'empêche de rendre Rab inactif couplé au GDP, le tout induisant ainsi la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane cytoplasmique et donc l'import de glucose dans la cellule²²⁴. mTOR est une serine/thréonine kinase phosphorylant les complexes mTORC1 et mTORC2 ce qui entraîne alors la phosphorylation de facteur d'initiation de la traduction, de la sous-unité p70 du ribosome et donc l'activation de la synthèse de protéine²²⁶. GSK3 est une sérine/thréonine kinase inhibant la synthèse de glycogène²³² dont la phosphorylation par AKT est inhibitrice, stimulant ainsi de manière indirecte la synthèse du glycogène²²⁷. FoxO1 est un facteur de transcription qui, une fois phosphorylé par AKT, est séquestré dans le cytoplasme, empêchant ainsi la stimulation de l'expression de gène clés dans la néoglucogénèse tel que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPK)^{228,233}.

L'activation du récepteur à l'insuline entraîne aussi l'activation d'un signal de terminaison pour inhiber la voie. Il existe cinq voies connues permettant l'inhibition de la voie de l'insuline après son activation. La première est l'internalisation du récepteur et de ces facteurs associés IRS1 et IRS2 et bien qu'il y ait un recyclage de ces protéines et une relocalisation à la membrane plasmique, une partie y est dégradée^{214,217,234}. Une hyperinsulinémie et une suractivation du récepteur à l'insuline entraîne ainsi une diminution de l'expression de IRS1 et IRS2²¹⁷. Des phosphatases actives constitutivement ou par la voie des MAPK/ERK permettent la déphosphorylation des protéines IRS et ainsi une atténuation du signal^{214,217}. La kinase JNK (kinase c-JUN-N-terminal) peut être activée par la voie PI3K mais aussi par une inflammation et l'activation du récepteur au

TNF α (facteur de nécrose tumoral), entraînant ainsi une phosphorylation inhibitrice d'IRS1²¹⁴. D'autres facteurs activés par l'inflammation (via les récepteurs aux cytokines) ou par le récepteur à l'insuline lui-même sont les SOCS (suppresseur de la signalisation des cytokines), permettant l'inhibition de la liaison entre le récepteur à l'insuline et les protéines IRS ou la dégradation des IRS, impliquant ainsi l'hyperinsulinémie et l'inflammation dans la résistance à l'insuline^{214,235}.

1.4.3. Le métabolisme des lipides

La bonne santé des adipocytes est souvent associée avec l'homéostasie entre la lipolyse et la lipogenèse et donc entre la libération de l'énergie et son stockage : un déséquilibre entre les deux peut provoquer des pathologies comme l'obésité (figure 1.12). La lipogenèse est stimulée lors de forte concentration de glucose (et par l'insuline), d'acides gras libres (AGL) et de triglycérides (TG) dans le sang^{236–239}. Les AGL peuvent passer librement les membranes phospholipidiques pour entrer dans les adipocytes. En revanche, le glucose nécessite les transporteurs membranaires GLUT (GLUT4 en particulier) dont l'expression et la localisation à la membrane sont stimulées par l'insuline et son récepteur (voir le paragraphe précédent). Les TG ne peuvent pas passer la membrane non plus et sont donc digérés par une protéine sécrétée par les adipocytes : la lipoprotéine lipase (LPL)^{239,240}. Le glucose, via une enzyme nommée la glycérol-3-phosphate déshydrogénase peut former du glycérol, qui peut être assemblé avec les AGL afin de stocker les lipides sous forme de TG dans les globules lipidiques des adipocytes²³⁹. Les enzymes nécessaires à la lipogenèse sont la synthase d'acide gras (FAS), formant des acides gras à partir d'acétyl-CoA, et les acyltransférases mono- et diacylglycérol permettant la formation des TG^{238,239}. Les TG sont maintenus dans les globules lipidiques grâce aux périlipines, en particulier la périlipine 1, qui sont des protéines situées à la surface des gouttelettes assurant le maintien de leur structure ainsi qu'une barrière physique contre les lipases²⁴¹.

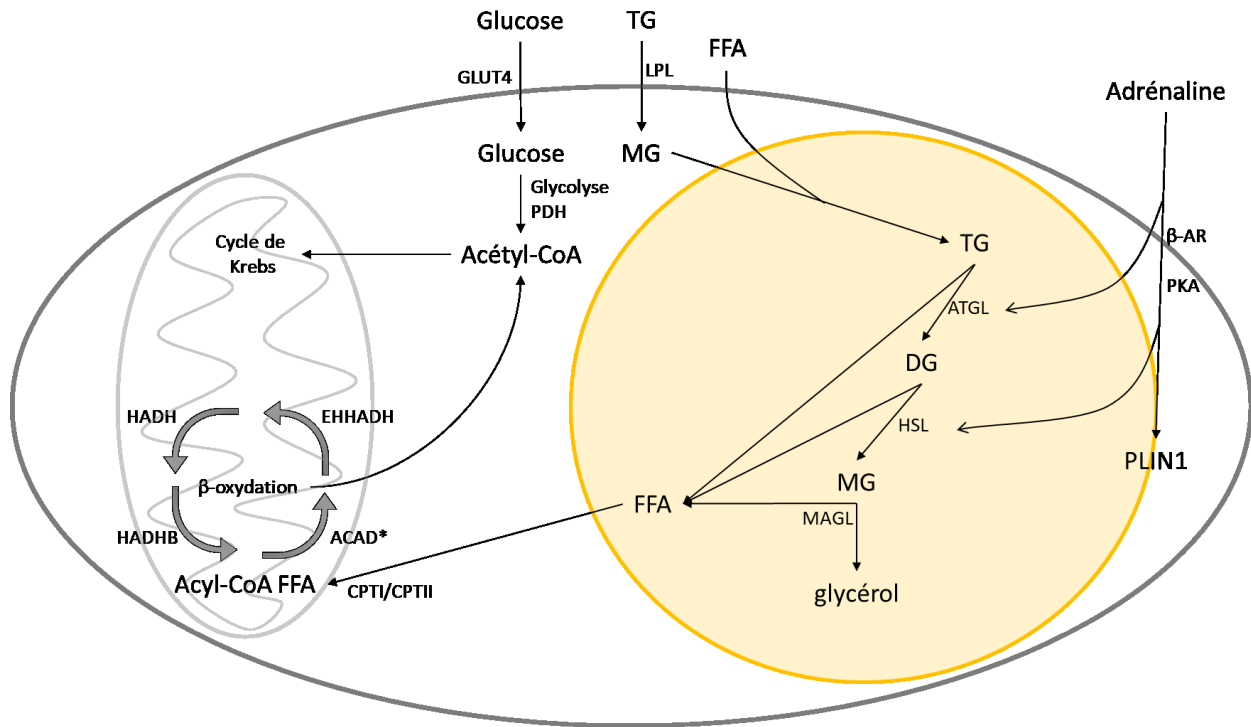


Figure 1.12 : Catabolisme des lipides et β -oxydation

L'import d'acides gras libres (AGL) dans les cellules se fait par l'intermédiaire de la lipoprotéine lipase (LPL) et l'import du glucose par le transporteur GLUT4. Les AGL sont stockés dans les cellules sous forme de triglycérides (TG). Les périlipines sont des protéines responsables du maintien des TG dans les globules lipidiques, formant ainsi une barrière afin d'éviter leur dégradation par les différentes lipases. En cas de demande énergétique, les TG stockés dans les globules lipidiques des adipocytes sont dégradés par une série de trois enzymes : ATGL, HSL et MAGL permettant la libération d'AGL et de glycérol. La périlipine 1 (PLIN1) est une protéine responsable de la structure des gouttelettes lipidiques, diminuant en partie le contact entre les lipases et les lipides. Les AGL peuvent être ainsi libérés dans la circulation pour fournir les autres tissus en énergie où ils seront dégradés majoritairement par la β -oxydation des lipides. La β -oxydation est un processus cyclique se déroulant en quatre étapes dont chaque cycle libère une molécule d'acétyl-CoA et réduit la longueur de la chaîne d'un AGL de deux carbones. L'acétyl-CoA peut ensuite être utilisé par le cycle de Krebs. La stimulation des récepteurs adrénergiques β par le système nerveux central permet la stimulation de la lipolyse par activation de ATGL et HSL, ainsi qu'une phosphorylation de PLIN1 permettant d'augmenter la surface d'interaction entre les lipides et les lipases.

Inversement, lorsque l'organisme a besoin d'énergie en période de jeûne, le WAT peut digérer ses réserves de TG afin de libérer des AGL dans le sérum et la lymphe pour fournir les autres tissus. Les enzymes majeures intervenant dans ce processus sont l'ATGL

(lipase adipocytaire des triglycérides), la HSL et la MAGL (lipase des monoacylglycérols)^{238,241–244}. ATGL permet la dégradation des TG en DG (diglycérides) et AGL, la HSL des DG en MG (monoglycéride) et AGL, et enfin MAGL les MG en glycérol et AGL. L'activité de ces enzymes peut être testée par la quantification des AGL et du glycérol circulant. Les AGL peuvent ensuite être oxydés afin d'être convertis en ATP via trois processus dégradatifs : l'alpha-, la beta- ainsi que la gamma-oxydation. Le processus majeur et le mieux décrit est la beta-oxydation se déroulant dans la matrice mitochondriale et est responsable de la dégradation des AGL à chaînes non-ramifiées²⁴⁵. Les carnitine palmitoyl transférases I et II sont des protéines situées à la membrane des mitochondries responsables de la translocation des AGL à chaîne longue ou à chaîne très longue, les AGL à chaîne moyenne ou courte peuvent passer librement la membrane des mitochondries²⁴⁵. La beta-oxydation est une voie cyclique de dégradation des AGL divisée en quatre étapes qui implique au moins 25 enzymes ou transporteurs. Chaque cycle consiste en la réduction de la chaîne du AGL de deux carbones et la libération d'une molécule d'acétyl-CoA représentant ainsi un rendement de 14 ATP²⁴⁵. L'acétyl-CoA peut ensuite être utilisé par le cycle de Krebs et compétitionne ainsi avec la glycolyse.

1.4.4. Les récepteurs adrénergiques et le métabolisme des lipides

Une voie importante dans la régulation de la biologie des adipocytes est la voie des catécholamines régulant de nombreuses fonctions comme la sécrétion d'adipokine, la différenciation ainsi que la balance entre la lipogenèse et la lipolyse²⁴⁶. La stimulation par les catécholamines et le système nerveux central sont aussi connus pour activer les voies thermogéniques dans le BAT^{247,248}. Les catécholamines sont reconnues dans le WAT par les récepteurs adrénergiques β ayant une activité lipolytique et par les récepteurs adrénergiques $\alpha 2A$ ayant une activité anti-lipolytique²⁴⁹. Ces récepteurs sont respectivement couplés aux protéines Gs et Gi, des protéines G ayant des effets opposés sur l'activité de l'adénylate cyclase et donc sur l'activité de la PKA (protéine kinase A), la première la stimulant et la seconde l'inhibant²⁴⁹. Un traitement aux catécholamines est différent entre le vWAT (tissu adipeux blanc viscéral) et le scWAT (tissu adipeux blanc

sous-cutané). En effet, elle stimule la lipolyse dans le vWAT (le ratio des récepteurs adrénergique $\beta/\alpha2A$ y est élevé) alors qu'elle l'inhibe dans le scWAT (le ratio des récepteurs adrénergique $\beta/\alpha2A$ y est faible)²⁵⁰. Il s'agit ainsi d'un contrôle fin du stock d'énergie exercé par le système nerveux central.

La PKA phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans le métabolisme des lipides. ATGL a par exemple été identifié comme étant phosphorylable sur cinq sérines et une thréonine par la PKA, augmentant ainsi la dégradation des TG²⁵¹. HSL avait été à l'origine identifiée comme lipase des TG, mais il est connu maintenant que son activité de dégradation est onze fois plus importante pour les DG que pour les TG²⁵². HSL peut être phosphorylé par PKA sur trois sérines entraînant une augmentation de son activité lipase de deux ou trois fois et une translocation de l'enzyme au niveau des gouttelettes lipidiques^{253,254}. La périlipine 1 (PLIN1) est une protéine associée au gouttelettes lipidiques servant à maintenir la structure de cette dernière et permettant de faciliter les interactions entre les lipases et les lipides. PLIN1 est phosphorylable par la PKA et cette phosphorylation est nécessaire pour une activité maximale des lipases²⁵⁵⁻²⁵⁷. La phosphorylation de PLIN1 par la PKA induit en plus une fragmentation et une dispersion de la gouttelette lipidique, augmentant ainsi la surface de liaison entre les lipases et les lipides^{256,258}. La stimulation adrénergique est ainsi une composante hormonale importante dans la régulation des réserves lipidiques.

1.4.5. La dépense énergétique : le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons

Le cycle de Krebs est à un point de convergence dans le métabolisme énergétique cellulaire, intégrant comme source d'énergie des molécules dérivées de la dégradation du glucose, des acides aminés dont la glutamine particulièrement et des AGL. A travers huit étapes, le cycle permet la production de plusieurs intermédiaires nécessaires à la base de la synthèse de nombreuses macromolécules, de la production d'énergie ainsi que d'accepteurs d'électrons qui sont utilisés ensuite par la chaîne de transport des électrons pour la production de plus d'énergie²⁵⁹. L'entrée dans le cycle se fait

majoritairement par la synthèse acétyl-CoA, bien qu'à partir des acides aminés il soit possible de produire de l'oxaloacétate et du succinyl-CoA afin de nourrir le cycle²⁵⁹.

En conditions aérobiques, une molécule de glucose permet la production de deux molécules de pyruvate à travers la glycolyse²⁵⁹. La liaison entre la glycolyse et le cycle de Krebs est assurée par le complexe enzymatique nommé pyruvate déshydrogénase (PDH), convertissant de manière irréversible le pyruvate en acétyl-CoA²⁶⁰. Certaines enzymes nommées les kinases de PDH (PDK 1 à 4) phosphorylent le complexe PDH inhibant ainsi la conversion du pyruvate provenant de la glycolyse, en acétyl-CoA²⁶¹. De manière intéressante, la beta-oxydation des lipides produit de l'acétyl-CoA sans passer par le pyruvate, rendant la beta-oxydation indépendante de l'activité de la PDH²⁴⁵. Les PDK deviennent ainsi des enzymes importantes dans le choix entre glucose et lipides comme source d'énergie. Le glucose permet ainsi la génération de 38 ATP en condition aérobique²⁵⁹. La glutamine est l'acide aminé le plus abondant de l'organisme et est souvent utilisé comme source d'énergie servant de transporteur d'azote pour la formation d'autres acides aminés non-essentiels, des acides nucléiques, des AGL ou encore de l' α -cétoglutarate (α -KG) permettant l'entrée dans le cycle de Krebs²⁵⁹.

Le cycle de Krebs consiste en une série de réactions d'oxydoréduction augmentant le potentiel d'électron contenu dans les deux principaux transporteurs d'électrons : la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et la flavine adénine dinucléotide (FAD^+), les convertissant ainsi en NADH et FADH_2 ²⁵⁹. Trois réactions sont irréversibles : la formation du citrate par la citrate synthase, la formation α -cétoglutarate (α -KG) par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) ainsi que la formation du succinyl-CoA par le complexe α -KG déshydrogénase. La vitesse du cycle est limitée par l'activité des enzymes isocitrate déshydrogénases dépendantes du NAD^+ (IDH3a, IDH3b et IDH3g) catalysant la réaction qui converti l'isocitrate en α -KG. IDH1 et IDH2 sont des isoformes cytoplasmiques (IDH2 est un peu retrouvé dans les mitochondries), permettant aussi la conversion de l'isocitrate en α -KG mais dépendent du NADP^+ , donnant ainsi du NADPH non-utilisable par la chaîne de transport des électrons²⁵⁹.

La chaîne de transport des électrons est une série de complexes intégrés dans la membrane interne des mitochondries permettant la conversion du NADH et FADH en

potentiel d'hydrogène de part et d'autre de la membrane dans un premier temps, et de convertir ce potentiel en ATP dans un second temps. Les complexes I et II convertissent le potentiel électronique contenu dans le NADH et le FADH respectivement en gradient électrochimique à travers la membrane interne des mitochondries pour le complexe I et en réduction d'un transporteur d'électron nommé ubiquinone pour les deux complexes^{262,263}. L'ubiquinone est ensuite oxydée par le complexe III permettant une nouvelle fois d'augmenter le potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane, ainsi que la réduction d'un second transporteur d'électron : le cytochrome c^{262,263}. Le complexe IV permet d'oxyder le cytochrome c et d'augmenter une nouvelle fois le potentiel électrochimique. Le dernier complexe est l'ATP synthase permettant la synthèse d'ATP à partir d'ADP et du potentiel électrochimique créé par les complexes I, III et IV^{262,263}. UCP1 est une protéine importante dans les capacités thermogéniques du BAT et intervient directement dans le découplage de cette dernière en éliminant le gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale, produisant ainsi de la chaleur à la place d'ATP^{264–266}.

1.5. Rôles des œstrogènes et de ERα dans le métabolisme énergétique

Cette dernière partie de l'introduction se concentre sur les impacts des œstrogènes et du récepteur aux œstrogènes dans le métabolisme énergétique. En effet, l'expression de ERα n'est pas limitée aux tissus impliqués dans la reproduction, mais est aussi détectable dans une variété de tissus allant de l'hypothalamus au WAT¹⁵. Les œstrogènes ont ainsi des rôles dans de multiples fonctions dans l'organisme comme l'immunité, le système cardiovasculaire mais aussi le métabolisme énergétique pour n'en faire qu'une liste non-exhaustive^{15,267,268}. De nombreux tissus sont impliqués dans le métabolisme énergétique : des tissus centraux comme l'hypothalamus ou l'hypophyse, mais aussi des tissus périphériques comme le WAT, le BAT, le foie, le muscle squelettique ou encore le cœur. Les effets des œstrogènes sur le métabolisme énergétique sont connus depuis longtemps et une information souvent citée à ce sujet est l'approbation de la supplémentation des

hormones à la ménopause (ou HRT) aux USA en 1941¹⁵. La HRT est un traitement composé d'œstrogènes associés ou non avec de la progestine (un progestatif) qui combat les symptômes de la ménopause comme les pathologies dégénératives cardiovasculaires, l'ostéoporose ou encore Alzheimer^{15,16}. Outre ces pathologies, la carence en œstrogènes survenant à la ménopause favorise les dysfonctions métaboliques amenant ainsi des prédispositions à l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type 2 ou encore certains cancers comme celui du sein, du colon ou les carcinomes hépatiques^{15,269}. La majorité des effets induits par les œstrogènes sur le métabolisme énergétique implique ER α . Une partie de ces effets est dépendante de ER β et de GPER, et cette dernière partie de l'introduction vise à comprendre les impacts de ces signalisations sur le métabolisme énergétique^{15,269,270}.

1.5.1. Impacts des œstrogènes sur le tissu adipeux blanc (WAT)

Les dépôts de WAT sont classés dans deux catégories : le WAT viscéral (vWAT) situé dans le péritoine, autour des organes, et le WAT sous-cutané (scWAT) situé sous la peau (figure 1.13). La distribution de ces dépôts est spécifique au sexe puisqu'un homme a des dépôts viscéraux plus importants que les sous-cutanés et inversement chez la femme : on parle de distribution androïde et gynoïde respectivement. Ces différences sont dues à des facteurs génétiques mais aussi à des facteurs hormonaux issus de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique²⁷⁰. Une perturbation de cet axe hormonal chez la femme entraînée par des pathologies caractérisées par de fortes concentrations d'androgènes circulant comme le syndrome des ovaires polykystiques ou une hyperplasie adrénale congénitale entraînent une distribution androïde des dépôts de WAT^{270,271}. Comme mentionné précédemment, la ménopause, qui est associée à une diminution importante des œstrogènes et de la progestérone circulants est aussi associée à une redistribution des dépôts de WAT d'une conformation gynoïde vers androïde^{15,270,272}.

Chez la souris ovariectomisée, un traitement à long-terme à l'E2 a montré que la balance entre la lipolyse et la lipogenèse est affectée, favorisant la première au dépend de la seconde²⁷³. Ainsi, la taille des adipocytes est diminuée et l'activité de la LPL, associée à

l'import d'AGL, est fortement diminuée avec le traitement à l'E2²⁷³. Chez la femme néanmoins, l'activité de la LPL est toutefois inchangée durant un traitement à la HRT, bien que l'activité de la LPL soit augmentée entre les femmes cyclantes non-ménopausées et ménopausées^{274,275}. La HRT diminue toutefois la taille des adipocytes dans le vWAT des femmes ménopausées²⁷⁴. D'autres gènes associés avec le stockage des lipides sont fortement réprimés avec le traitement à long-terme à l'E2 chez la souris, tels que l'acétyl-CoA carboxylase (*Acaca*), la synthétase d'acide gras (*Fasn*), la sterol regulatory element-binding protein (*Srebf1*)²⁷³. HSL, responsable de la dégradation des TG et des DG en MG en périphérie des gouttelettes lipidiques a une activité et une expression accrue après un traitement à l'E2 sur des adipocytes sous-cutanés en culture²⁷⁶. Ces résultats sont reproduits dans un modèle murin d'obésité induite par une nourriture riche en gras (HFD) où l'E2 prévient l'accumulation de TG et est associé avec une diminution de l'expression des gènes lipogéniques²⁷⁷. Ces résultats sont en grande partie dus à ER α puisque chez la souris ovariectomisées, un traitement au PPT (agoniste sélectif de ER α) mime les effets de E2 sur la prise alimentaire et le poids et non le DPN (agoniste sélectif de ER β)²⁷⁸. Le traitement à l'E2 rend aussi les adipocytes plus sensibles aux catécholamines, une hormone produite par le système nerveux central et d'une importance majeure dans la lipolyse et l'activation des adipocytes (voir paragraphe sur les catécholamines). De manière intéressante, l'E2 est capable d'augmenter l'expression du récepteur adrénergique α 2A dans le scWAT mais pas dans le vWAT chez l'humain, laissant penser alors que la distribution des dépôts de WAT pourrait être en partie dû à la modulation de ce ratio par l'E2²⁷⁹.

Le KO global de ER α chez la souris (ER α KO) induit une augmentation de la taille de tous les dépôts de WAT, alors qu'à l'inverse, les souris ER β KO ne deviennent pas obèses. Cependant, les souris GPERKO deviennent en surpoids tardivement, après 18 à 20 semaines de vie^{280–282}. De manière intéressante, les phénotypes métaboliques observés dans les souris ER α KO, les souris ovariectomisées ainsi que les souris invalidée génétiquement pour le gène de l'aromatase (ArKO) sont similaires et sont reversés par un traitement à l'agoniste PTT et non au DPN (pour les souris ovariectomisées et ArKO)²⁸³. Cela n'exclut néanmoins pas l'impact de ER β sur le métabolisme énergétique, puisqu'il est exprimé dans les adipocytes et qu'il permet l'inhibition de PPARG dans le

modèle cellulaire des 3T3-L1 et dans le vWAT murin²⁸⁴. PPAR γ est un récepteur nucléaire agissant avec PPAR α et PPAR δ comme chef d'orchestre dans les adipocytes, contrôlant la transcription de multiples gènes impliqués dans l'adipogenèse, la lipogenèse, la lipolyse ou encore le transport des lipides pour n'en faire qu'une liste non exhaustive²⁸⁵. L'impact de ER β sur le métabolisme énergétique est aussi observé chez les souris obèses HFD où le KO du gène de ER β entraîne une exacerbation de la prise de poids par rapport aux souris contrôles²⁸⁴. Ensemble, ces résultats montrent que E2 affecte la balance entre lipogenèse et lipolyse au profit de la lipolyse d'une manière dépendante de ER α et dans une plus infime partie de ER β .

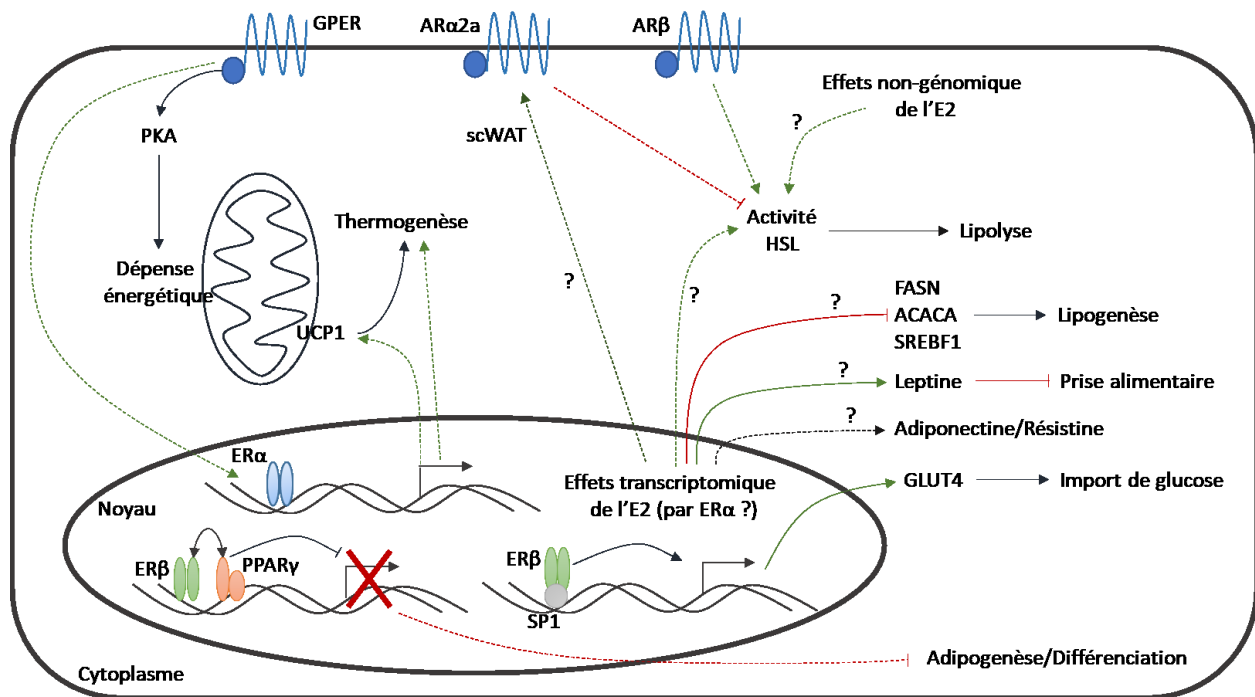


Figure 1.13 : Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les adipocytes (humains et murins)

L'E2 et les trois récepteurs aux œstrogènes affectent de nombreuses voies de signalisation dans les adipocytes. Les mitochondries sont associées à une augmentation de la dépense énergétique après une stimulation à l'E2 par des effets dépendants de ER α et de GPER, ce qui est corrélé avec une différenciation en adipocyte beige. La balance entre lipogenèse et lipolyse est aussi affectée puisqu'une stimulation à l'E2 diminue l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et permet l'augmentation de l'activité de la HSL impliquée dans la lipolyse. Parallèlement, dans le tissu adipeux sous-cutané, l'E2 augmente l'expression des récepteurs adrénergiques α 2a affectant ainsi la balance avec les récepteurs adrénergiques β et favorisant une inhibition de la lipolyse. ER β , en collaboration avec PPAR γ d'une part permet une inhibition de l'adipogenèse, en

collaboration avec SP1 permettrait l'expression de GLUT4 favorisant ainsi l'import de glucose. L'E2 semble plutôt favoriser la synthèse de leptine, limitant ainsi la prise alimentaire. Les effets de l'E2 sur l'adiponectine ou la résistine sont toutefois encore controversés.

Outre ses effets sur le métabolisme des lipides, l'E2 a aussi un impact majeur sur la voie de l'insuline et le métabolisme du glucose. En effet, les souris ER α KO ont une résistance à l'insuline accrue à l'échelle de l'organisme, et les études liant positivement l'E2 et la sensibilité à l'insuline sont nombreuses^{286–289}. Cette corrélation est aussi observable chez l'humain puisque les femmes ménopausées ont un risque accru d'intolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline diminué, et ce phénotype est contrecarré par la HRT¹⁵. Néanmoins, chez le rat mâle, l'expression de *Esr1* dans les adipocytes ne semble pas associée avec la tolérance au glucose à l'échelle de l'organisme²⁹⁰. De manière intéressante, ER β serait impliqué dans le contrôle de l'expression de *Glut4*, puisque des adipocytes issus de souris ER β KO et non de ER α KO ont un site de liaison à Sp1 contrôlant *Glut4* hyperméthylé²⁹¹. Dans les 3T3-L1, des études ont de plus montré que ER α favorise l'import de glucose par la phosphorylation de IRS1^{292,293}.

En plus de ses activités génomiques, E2 démontre des effets hors du noyau grâce à la présence de ER α à la membrane plasmique ou dans les mitochondries et à la présence de GPER à la membrane plasmique^{151,294,295}. GPER est exprimé dans les tissus impliqués dans le métabolisme énergétique comme dans le WAT et est un récepteur membranaire couplé à une protéine G capable d'être activé par l'E2¹¹. Il a été impliqué dans de nombreux processus comme le métabolisme énergétique, l'immunité ou la reproduction et dans le WAT, il a été identifié comme favorisant la lipolyse au détriment de la lipogenèse et de l'inflammation¹¹. L'émergence de GPER dans le métabolisme est récente et contrairement à ER α et ER β , ses rôles commencent juste à être découverts. Les études sur ce récepteur se font par KO du gène total ou spécifique au tissu ou par agoniste spécifique (G1) ou antagoniste spécifique (G15 ou G16)^{188,282,296}. Les souris GPERKO, KO pour le gène *Gper*, présentent une augmentation de poids et de l'adiposité, comme observé chez les souris ER α KO, mais seulement à partir de 18 à 20 semaines, et ce, sans changement dans la prise alimentaire²⁸². Dans le modèle des 3T3-L1, exprimant GPER, le récepteur améliore la fonction mitochondriale, et donc la dépense énergétique

et la production d'ATP par un processus dépendant de PKA²⁹⁷. De plus, toujours dans les 3T3-L1, l'activation de GPER permet la phosphorylation de ER α sur la ser118, synonyme de stabilisation dans l'état activé du récepteur et de recrutement des coactivateurs²⁹⁷. D'autres études seront nécessaires pour décortiquer les effets de GPER sur le métabolisme énergétique dans le vWAT ainsi que les réactions croisées pouvant exister avec ER α et ER β .

La thermogenèse est un processus en grande partie assuré par le BAT qui permet l'utilisation des lipides comme source de carburant pour faire de la chaleur. De manière intéressante, le BAT exprime ER α traduisant peut-être la présence de plus de BAT chez la femme par rapport l'homme²⁹⁸. Chez les rongeurs, le même phénotype est retrouvé où les femelles ont plus de capacité thermogénique du BAT, associée à des mitochondries plus larges et plus nombreuses par rapport aux mâles^{299,300}. Ces résultats sont associés avec une plus grande expression de UCP1 dans le BAT des femelles et à une chute de la capacité thermogénique et de l'expression de UCP1 dans le BAT après ovariectomie^{301,302}. La thermogenèse du BAT est contrôlée en partie par l'hypothalamus et la stimulation adrénergique puisqu'une stimulation à l'E2 spécifiquement dans le nœud VMN (nœud ventro-médian) induit une baisse de l'expression des gènes thermogéniques *Ucp1* ou *Pgc1 α* dans les dépôts de BAT³⁰³. De manière intéressante, ce contrôle est dépendant du cycle œstral de la souris avec plus de thermogenèse dans le BAT durant la phase de proœstrus par rapport aux autres³⁰³. L'E2 stimule aussi la thermogenèse par le brunissement des dépôts de WAT d'une manière dépendante de ER α , bien que les mécanismes moléculaires associés ne soient pas encore bien compris³⁰⁴.

Le WAT n'est pas seulement responsable du stockage des lipides, il est aussi considéré comme un tissu endocrinien majeur avec la sécrétion d'hormones peptidiques spécialisées nommées adipokines³⁰⁵. Ces hormones jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme, mais pas seulement, puisqu'elles ont été identifiées comme ayant un impact majeur sur des fonctions comme la reproduction³⁰⁶. Les œstrogènes influenceraient la sécrétion de ces hormones mettant en évidence alors un véritable dialogue entre le système reproducteur et les œstrogènes d'une part et le WAT et les adipokines d'autre part.

La leptine est l'adipokine la mieux caractérisée à ce jour. Elle joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'appétit et une délétion de son gène dans les souris ob/ob entraîne l'obésité³⁰⁷. Les premières évidences d'un lien entre les œstrogènes et la leptine montrent que sa concentration sérique est plus élevée chez les femmes par rapport aux hommes et qu'elle est corrélée avec les niveaux sériques d'E2 chez les femmes pré-ménopausées^{308,309}. Ces données sont cependant à mettre en corrélation avec le fait que cette différence existe aussi chez les enfants prépubères³¹⁰. Des facteurs spécifiques au sexe autre que les œstrogènes entrent sûrement en jeu dans ce phénomène. La concentration en leptine varie entre les phases du cycle œstral de la souris, avec des concentrations plus importantes dans les phases œstrus et metœstrus, ce qui peut être associé à une prise de nourriture qui varie au cours du cycle^{311,312}. La stimulation par E2 de vWAT et scWAT en culture a aussi été montré comme augmentant l'expression du gène de la leptine ainsi que sa sécrétion³¹³. A l'inverse, chez les souris ArKO, les niveaux de leptine sont élevés et une injection d'E2 renverse ce phénomène³¹⁴. De manière intéressante, l'E2 a un effet "leptino-mimétique" puisque les souris ob/ob traitées à l'E2 diminuent leur prise de nourriture et augmentent leur dépense énergétique, ce qui entraîne une perte de poids¹⁹. La stimulation par E2 de cellules 3T3-L1 ne semble pas augmenter l'expression et la sécrétion de leptine, mais comme cette lignée n'exprime ni ER α ni ER β , cette donnée n'est pas surprenante^{315,316}. Ensemble, ces résultats montrent que l'E2 augmenterait l'expression de la leptine dans le WAT mais que d'autres facteurs non identifiés entreraient en jeu pour expliquer le dimorphisme sexuel observé.

L'adiponectine est une autre adipokine très étudiée qui permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline ainsi que le métabolisme des lipides³¹⁷. De manière opposée aux autres adipokines, l'adiponectine est inversement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC)³¹⁸. Contrairement à la leptine où une corrélation positive avec l'E2 est majoritairement observée, le lien entre l'adiponectine et l'E2 est plus controversé. Les niveaux d'adiponectine et d'E2 semblent inversement corrélés chez la souris adulte, mais chez la souris jeune l'E2 semble stimuler la sécrétion d'adiponectine à la puberté³¹⁹. La stimulation par l'E2 de 3T3-L1 montre quant à elle une diminution de la sécrétion de l'adiponectine³¹⁵. Une inhibition de Rho-kinase contrant cet effet montre que cette augmentation peut être associée à GPER, les récepteurs ER α et ER β n'étant pas

exprimés dans les cellules 3T3-L1^{315,316}. Cet effet n'est pas reproduit dans la lignée adipocytaire humaine SBGS où l'E2 n'a aucun effet sur la sécrétion d'adiponectine³²⁰. Ces résultats et ces contradictions sont aussi à mettre en perspective avec le fait que l'adiponectine est produite majoritairement par un type particulier d'adipocytes : les adipocytes de la moelle osseuse³²¹.

La résistine est la troisième adipokine la plus étudiée, elle est produite par le WAT chez les rongeurs mais est sécrétée exclusivement par les tissus immunitaires et épithéliaux chez les primates³²². Le nom de la résistine vient du fait que cette hormone est associée à une résistance à l'insuline³²³. Les données existant sur les effets de la résistine sont assez controversées surtout entre espèces. D'un côté, elle induit la lipolyse et supprime la sécrétion de l'adiponectine sans affecter la voie de l'insuline dans les adipocytes humains^{324,325}, de l'autre elle inhibe la signalisation de l'insuline et l'adipogenèse et accélère la dépense énergétique des adipocytes murins³²⁶. Comme pour l'adiponectine, les résultats concernant l'impact de l'E2 sur la résistine sont, bien que moins nombreux, tout autant controversés. L'injection d'E2, autant chez le rat que chez la souris, induit une diminution de la sécrétion de résistine par le vWAT^{327,328}. Chez l'humain, contrairement aux autres adipokines, il n'y a pas de différence dans la concentration de résistine circulante entre les sexes et les différents stades de la puberté, suggérant aucun effet de l'œstradiol sur la résistine³²⁹. A l'opposé, la stimulation par l'E2 des cellules 3T3-L1 induit une augmentation de l'expression de la résistine³¹⁵. Le rôle de la résistine et l'effet de l'E2 sur la résistine sont encore trop nébuleux pour pouvoir tirer une quelconque conclusion.

Bien que les effets de l'E2 sur la balance lipolyse/lipogenèse ou sur la sécrétion de leptine semblent claires, les effets sur la voie de l'insuline, sur les autres adipokines ou encore le côté moléculaire de la voie de l'E2 sont encore incertains et restent à être élucidés.

1.5.2. Impacts des œstrogènes sur le muscle squelettique

Une des conséquences majeures de la perte de ER α ou des œstrogènes est le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type II¹⁵. Ainsi les femmes

préménopausées ont une incidence plus faible de cette pathologie par rapport aux hommes du même âge et aux femmes ménopausées¹⁵. Parallèlement, une grande partie des effets de l'insuline sur le métabolisme du glucose est portée par les muscles squelettiques³³⁰. Chez les rongeurs, l'E2 promeut l'absorption stimulée par l'insuline du glucose dans le muscle squelettique^{331,332}. Les études sur les souris ER α KO ou sur la perte sur le long terme de la sécrétion d'E2 (ArKO ou ovariectomie par exemple) observent une résistance à l'insuline générale. Cependant, est-ce que cet effet est dû au développement de l'obésité à cause de la perte de ER α dans le vWAT ou directement à la perte de ER α dans les muscles squelettiques. Des études se sont alors intéressées aux actions spécifiques de ER α dans le muscle squelettique pour tenter d'y répondre (figure 1.14).

GLUT4 est une cible majeure de la voie de l'insuline et sa translocation à la membrane plasmique en est la finalité concernant l'import du glucose au sein des cellules. La résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques des souris ER α KO a été dans un premier temps liée à une baisse de l'import du glucose, et il a été suggéré que cette baisse pouvait être due à une diminution de l'expression de GLUT4 dans le muscle squelettique³³³. Des données plus récentes ont montré que l'expression de GLUT4 n'est pas modulée par ER α dans le muscle squelettique et suggèrent que cette résistance est due à une perte de réponse du récepteur à l'insuline à la suite de l'activation des voies de l'inflammation (la voie JNK)²⁸⁷. De nombreux facteurs de transcription régulent l'expression de GLUT4 (MEF2, PPARs, C/EBP, FOXO1), mais aucun lien n'a été établi entre cela et ER α . Globalement, les études récentes à ce sujet s'accordent à dire que la résistance à l'insuline dans les souris ER α KO n'est pas due à une baisse du pool de GLUT4 disponible³³⁰. Ces résultats sont de plus répétables dans un modèle de souris KO pour *Esr1* spécifiquement dans le muscle squelettique (MERKO)³³⁴. Un traitement à l'E2 a aussi été associé à l'augmentation de l'expression de IRS1 et à la phosphorylation de AKT, potentialisant alors la voie de l'insuline dans le muscle squelettique^{331,335}.

ER α musculaire a aussi été associé avec la fonction mitochondriale : les souris ER α KO et MERKO développent des défauts au niveau de leurs mitochondries musculaires amenant à la production de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS)³³⁴. Ces

défauts sont corrélés avec une diminution de l'expression de *Polg1*, l'ADN polymérase mitochondriale, et du taux de réplication de l'ADN mitochondrial³³⁴. E2 ne permet pas de moduler l'expression de *Polg1* en l'absence de ER α et la présence d'un ERE au promoteur de *Polg1* suggère que ce gène est une cible de ER α . De plus, ER α et un traitement à l'E2 sont aussi impliqués dans la fission des mitochondries puisque les souris MERKO possèdent des mitochondries allongées et élargies suggérant une diminution de leur taux de fission³³⁴. Une autre action de l'E2 sur les mitochondries musculaires est une action directe de la molécule et indépendante de ER α . En effet, l'E2 est capable de s'intégrer dans la membrane interne des mitochondries affectant ainsi directement la viscosité de celle-ci et les complexes de la chaîne de transport des électrons³³⁶. La conséquence est que la perte de l'E2 lors d'une ovariectomie entraîne une dysfonction de la chaîne de transport des électrons, en particulier des complexe I et III et mène à une surproduction de ROS et une baisse de la dépense énergétique³³⁶.

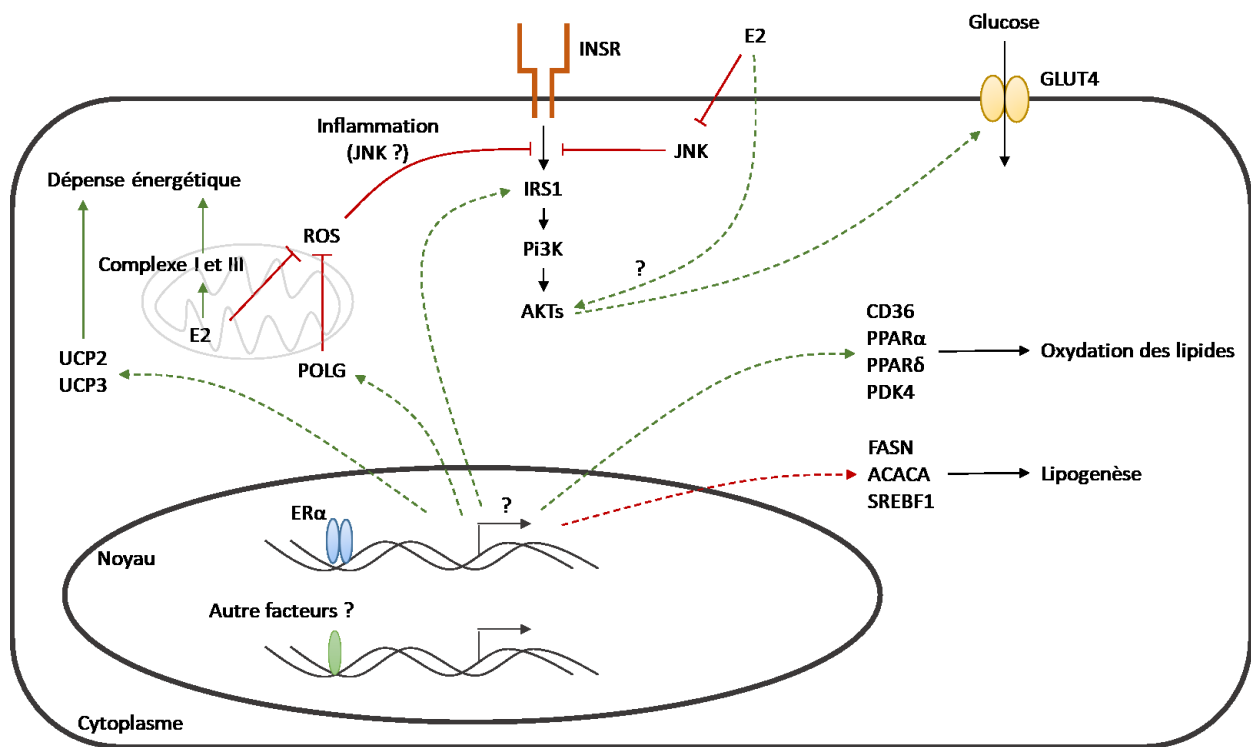


Figure 1.14 : Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les cellules musculaires squelettiques

Les processus biologiques affectés par l'E2 dans les cellules musculaires squelettiques sont principalement non-génomiques. ER α nucléaire n'a pour le moment jamais été

associé directement avec les effets présentés dans cette figure. La mitochondrie est une cible majeure de l'E2 dans les cellules musculaires squelettiques et la dépense énergétique y est grandement favorisée au dépend de la formation de ROS. En effet, les expressions de UCP2 et UCP3 sont augmentées ainsi que l'intégration directe de la molécule d'E2 dans la membrane interne des mitochondries favorisant conjointement la dépense énergétique. Parallèlement, l'expression de POLG, une polymérase mitochondriale stimule la biogenèse de nouvelles mitochondries favorisant une nouvelle fois la dépense énergétique et diminuant la production de ROS. La voie de signalisation de l'insuline est aussi affectée par l'E2 dans les cellules musculaires squelettiques. En particulier, les ROS produits par les mitochondries en l'absence d'E2 ou une inhibition de la voie JNK par l'E2 expliquerait le développement d'une résistance à l'insuline dans les cellules musculaires squelettiques en l'absence d'E2. Une expression augmentée de IRS1 et une augmentation de l'activité de AKT expliqueraient en parallèle l'amélioration de la réponse à l'insuline en présence d'E2. La balance entre lipogenèse et oxydation des lipides est aussi affectée par la présence d'E2. Néanmoins, aucun résultat ne permet de conclure sur les impacts relatifs des ER α nucléaire et ER α cytoplasmique.

Les souris MERKO ont aussi la particularité de devenir obèses, au même titre que les souris ER α KO et FERKO^{334,337}. La β -oxydation des lipides est plus utilisée comme source d'énergie dans le muscle des femmes préménopausées par rapport aux hommes du même âge ce qui peut expliquer en partie ce résultat³³⁰. Le traitement à l'E2 stimule l'expression de CD36 (protéine de transport des acides gras), de *Ppara* et *Ppard*, et d'autres gènes impliqués dans l'oxydation des lipides³³⁸⁻³⁴⁰. E2 permet aussi l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse, ainsi que l'augmentation de gènes impliqués dans la capacité oxydative du muscle²⁷³. Ces résultats sont néanmoins des effets indirects dû à l'activation de ER α dans d'autre tissus, puisque les souris MERKO présentent des taux basaux de l'expression de ces gènes³³⁰. Le rôle du ER α musculaire comme régulateur indirect de l'adiposité est montré avec les souris MERKO, mais les facteurs en jeu dans ce processus ne sont pas à ce jour caractérisés.

1.5.3. Impacts des œstrogènes sur le foie

Contrairement au muscle squelettique, le foie a un rôle prédominant dans la résistance à l'insuline et dans l'intolérance au glucose comme le montre les modèles de KO du récepteur à l'insuline spécifique au foie^{341,342}. Néanmoins, les études sur les effets de la perte des œstrogènes ou de ER α sur la résistance à l'insuline sont controversés. En effet,

une étude montre que la résistance à l'insuline dans les souris ER α KO est majoritairement due au foie alors qu'une seconde, dans le même modèle, suggère que le foie y joue un rôle mineur au détriment du muscle squelettique^{287,333,334}. L'accumulation de TG dans le foie se produit en réponse à la perte de sécrétion des œstrogènes et est associée à une résistance accrue à l'insuline dans le tissu^{343,344}. Récemment, les impacts des ER α membranaire et nucléaire sur la résistance à l'insuline ont été décortiqués montrant un impact majeur de la signalisation nucléaire de ER α dans la résistance à l'insuline dans le foie. Le rôle direct de E2 et de ER α sur la voie de l'insuline dans le foie reste toutefois incertain à ce jour (figure 1.15).

Le métabolisme des lipides hépatiques est aussi affecté dans le foie des souris ER α KO puisque les gènes lipogéniques, tels que *Fas*, *Acaca* ou *Srebp1c*, sont diminués par l'E2 chez la souris sûrement de manière indirecte via l'augmentation de l'expression de *Stat3*^{273,345,346}. En parallèle, le traitement aux œstrogènes prévient la lipogenèse dans le foie par le maintien de la phosphorylation de ACACA^{347,348}. ER α , et plus particulièrement sa forme membranaire, a été impliqué dans le maintien de la phosphorylation de AMPK α dans des souris sauvages, ce qui permet la phosphorylation de SREBF1 et ainsi la diminution de la lipogenèse contrecarrant les effets de l'insuline dans le foie³⁴⁹. Plus récemment, l'expression de *Fgf21* a été montrée comme étant stimulée par l'E2 favorisant ainsi l'oxydation des lipides dans le foie³⁵⁰. Le ChIP-on-chip et ChIP-seq de ER α ont été effectué dans le foie et indiquent que la liaison de ER α se fait proche de gènes inclus dans les classes de biosynthèse des lipides et du métabolisme des acides gras^{345,351}. De manière intéressante, le ER α hépatique ne semble pas se fixer directement à l'ADN mais via un autre facteur : HNF4a^{352,353}. Cela explique en partie pourquoi les sites de liaison de ER α identifiés entre les tissus comme l'utérus, l'aorte ou le foie sont très différents, et pourquoi l'action des œstrogènes est différente entre les tissus³⁵³.

L'action du ER α hépatique a été plus spécifiquement étudiée dans les souris LERKO (KO pour *Esr1* dans le foie spécifiquement). ER α hépatique est important pour le déroulement du cycle œstral chez la souris via la stimulation de la sécrétion de IGF-1³⁵⁴. Les souris LERKO ont aussi une augmentation du dépôt de TG dans le foie bien que cet effet peut-être indirectement lié à la diminution de l'expression de IGF-1, qui entraîne elle-même

une diminution de l'activité de HNF4a³⁵¹. Des données plus récentes montrent que les souris LERKO ne grossissent pas par rapport aux souris contrôles et que ERα hépatique a très peu d'action sur la résistance à l'insuline et la tolérance au glucose à l'échelle de l'organisme³⁵⁵. Bien que les effets des œstrogènes et de ERα dans le foie soient important pour le tissu en lui-même, ils semblent limités sur l'entièreté de l'organisme.

L'action des œstrogènes, de l'E2 et en particulier d'agonistes sélectifs de ERα ont donné des résultats divergents entre les différentes études qui les ont utilisés¹⁵. Ceci pourrait s'expliquer par des résultats identifiant les acides aminés provenant de la digestion comme agoniste de ERα dans le foie³⁵⁴. L'activation de ERα par les acides aminés est en plus associée à l'activation de nombreux processus métaboliques impliqués notamment dans le métabolisme des acides aminés³⁵⁶. Ce processus est particulièrement dépendant du sexe contrairement à ce qui est observé dans les autres tissus comme le muscle squelettique ou le WAT³⁵⁶. Cette différence est expliquée par l'expression de *Esr1* dans le foie à l'état fœtal spécifiquement dans les souris mâles³⁵⁶. Ainsi, le ERα fœtal mâle apposerait une marque épigénétique au niveau de la chromatine du foie masculin qui serait absent chez la femelle et qui entraînerait une masculinisation du foie et des effets de ERα spécifique au sexe à l'âge adulte malgré un traitement similaire³⁵⁶. Ainsi dans le foie des souris femelles, le métabolisme des acides aminés est orienté vers la production de lipides et de glucose, en particulier dans la phase metœstrus, afin de favoriser l'implantation d'un éventuel embryon et de pallier une période de disette³⁵⁶. La différence entre le foie des mâles et des femelles est ainsi moins marquée en période de proœstrus où la concentration en E2 est plus importante et où les réserves lipidiques ne sont plus essentielles à une éventuelle gestation³⁵⁶.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent un rôle de ERα dans le foie au carrefour entre les impacts sur la voie de l'insuline dans le muscle squelettique et sur la voie du métabolisme des lipides dans le WAT.

traitement par la streptozotocine (STZ), une drogue utilisée pour induire le diabète de type I chez les rongeurs par apoptose spécifique des cellules β ³⁵⁸. E2 et ER α préviennent aussi l'apoptose des cellules β en cas de stress oxydatif induit par une trop forte concentration de glucose ou de lipide^{359,360}. Inversement, une trop forte concentration de glucose induit l'expression de ER α dans les cellules β permettant ainsi la protection des cellules contre l'apoptose, et stimulant aussi parallèlement la synthèse d'insuline^{359,361,362}. La voie ERK est impliquée dans ce processus suggérant une action non-génomique de E2 dans ce cas-ci³⁶¹. E2 et ER α préviennent aussi l'accumulation de lipides par l'activation de deux voies, celle de STAT3 et celle de l'AMPK diminuant indirectement la synthèse des lipides et stimulant leur oxydation³⁶³. L'importance des effets extranucléaires de E2 a de plus été montrée dans les cellules β puisque les effets protecteurs de ER α sont indépendant de la synthèse d'ARN et de protéines^{364,365}. En collaboration avec ER α , GPER a aussi été impliqué dans la survie des cellules β en réponse à la STZ et dans la stimulation de la sécrétion d'insuline suivant une hyperglycémie³⁶⁵. Plus récemment, il a été montré que les œstrogènes protègent les cellules β contre l'apoptose en favorisant la dégradation de la proinsuline mal repliée³⁶⁶. Cette action se fait par une collaboration entre les actions génomiques du ER α nucléaire et les actions non-génomique du ER α membranaire³⁶⁶. En effet, la voie ERAD (dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique) permet la dégradation de la proinsuline mal repliée grâce à la répression génique de UBC6e (une ubiquitine transférase responsable de la dégradation des protéines de la voie ERAD) par ER α nucléaire ainsi que par sa dégradation protéosomale induite par le ER α membranaire³⁶⁶.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la régulation des fonctions des cellules β des ilots de Langerhans par E2 implique une collaboration entre les voies génomiques et non-génomiques de ER α ainsi que les voies non-génomiques de GPER.

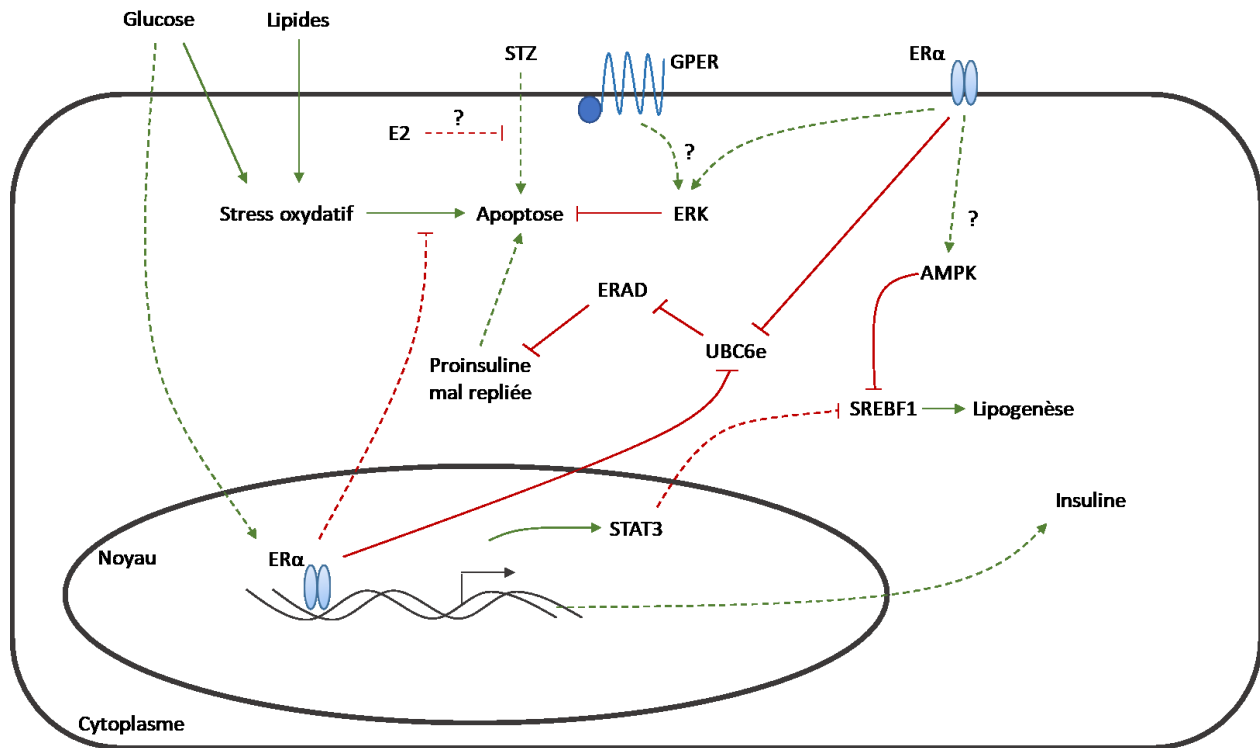


Figure 1.16 : Impacts moléculaires connus de l'E2 sur les cellules β des ilots de Langerhans

Le métabolisme du glucose est influencé de manière globale par l'E2 et par ER α , et en plus des tissus cibles de l'insuline, les cellules β des ilots de Langerhans, productrices d'insuline, sont aussi des cibles directes d'E2 et ER α . Bien que le processus sous-jacent soit encore inconnu, les fortes concentrations en glucose permettent une expression accrue de ER α . Parallèlement, l'activation de ER α permet une synthèse accrue d'insuline. De nombreux effets de la voie E2 et ER α sont étudiés dans les cas de protection contre l'apoptose des cellules β des ilots de Langerhans. Par une voie encore inconnue, un traitement à l'E2 protège les cellules β de l'apoptose induite par la STZ. E2 et ER α protègent aussi les cellules β de l'apoptose induite par un stress oxydatif causé par de trop forte concentration en lipides et en glucose. GPER ou ER α membranaire permettent aussi une activation de la voie des kinases ERK, prévenant une nouvelle fois l'apoptose des cellules β . Par l'augmentation de l'expression de STAT3 ainsi que par l'activation de AMPK, ER α membranaire et nucléaire participent à l'inhibition de la lipogenèse prévenant alors l'accumulation de lipides dans les cellules β ainsi que leur cytotoxicité associée. Une autre collaboration entre les ER α membranaire et nucléaire a été observée dans les cellules β où UBC6e, une protéine inhibant la voie ERAD nécessaire à la dégradation de la proinsuline, est dégradée par ER α membranaire et son gène est réprimé par le ER α nucléaire. L'accumulation de proinsuline favorise l'apoptose des cellules β .

1.5.5. Impacts des œstrogènes sur le système nerveux central

Les œstrogènes et ER α ont été très longtemps associés seulement avec leur impact sur la prise alimentaire. Une ovariectomie entraîne chez les souris une hyperphagie qui avait été associée à la prise de poids^{19,367}. Des souris nourries avec des quantités contrôlées de nourritures ont montré qu'il ne s'agissait pas seulement d'une hyperphagie, mais que les œstrogènes ont aussi un rôle périphérique¹⁸. Néanmoins, les effets des œstrogènes sur la prise alimentaire ont été associés à l'expression de ER α dans de nombreux nœuds de l'hypothalamus. Les nœuds exprimant ER α sont les nœuds arqué (ARC), ventromédian (VMN) et paraventriculaire³⁶⁸.

Plus particulièrement, les neurones POMC de l'ARC sont impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire par la sécrétion de α MSH et de POMC, qui agissent sur les neurones des nœuds paraventriculaire et latéral, induisant une baisse de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique¹⁵. Les neurones POMC expriment particulièrement ER α et un traitement à l'E2 augmente l'activité des synapses de ces neurones¹⁹. Ce résultat est observé aussi en proœstrus où la concentration d'œstrogènes circulants est la plus grande¹⁹. À l'inverse, les niveaux de POMC sont diminués dans les souris ER α KO, montrant un contrôle via ER α sur l'expression de POMC³⁶⁹. De plus, la délétion de *Esr1* spécifiquement dans les neurones POMC suffit à induire une hyperphagie sans influencer néanmoins la dépense énergétique et la distribution des dépôts de WAT³⁷⁰.

Une lésion spécifique du nœuds VMN entraîne une obésité qui est le résultat d'une prise alimentaire accrue ainsi qu'une baisse de la dépense énergétique³⁷¹. Ces neurones expriment le facteur SF1 (facteur stéroïdogénique 1) dont la délétion entraîne une destruction du VMN et le développement de l'obésité^{372–374}. Les neurones du VMN expriment aussi ER α et sa délétion spécifiquement dans une sous-population exprimant SF1 réduit la perte de poids induite par E2, augmente la taille des dépôts de vWAT et réduit la dépense énergétique, sans impact sur la prise alimentaire^{370,375}. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que E2 agit sur les neurones POMC dans le contrôle

de la prise alimentaire et sur les neurones du VMN dans le contrôle de la dépense énergétique et la distribution des dépôts de WAT.

Le récepteur à la leptine LEPR est aussi présent dans les nœuds VMN et ARC et son expression dans l'ARC semble colocalisée avec celle de ER α ³⁷⁶. Il a été montré que les œstrogènes régulent l'expression du gène *Leprb*, en particulier dans le nœud ARC³⁷⁷. Les œstrogènes ont aussi été associés avec une augmentation de la sensibilité centrale à la leptine bien qu'aucune interaction directe entre les œstrogènes et la leptine n'ait été observée^{378,379}. De plus, une résistance à la leptine s'installe dans les nœuds hypothalamique des souris ovariectomisées et dans les souris gestantes marquant une nouvelle fois un lien entre les voies de la leptine et celle des œstrogènes³⁷⁹.

1.6. Objectifs et hypothèses

Prises dans leur ensemble, ces dernières données montrent que les œstrogènes et ER α affectent à de multiples niveaux le métabolisme énergétique, tant au niveau central sur l'hypothalamus qu'au niveau périphérique sur le WAT, le BAT, le muscle squelettique ou le foie. Le démêlage de toutes ces actions n'est encore qu'au début et peu de choses sont encore comprises sur l'impact des œstrogènes et de ER α sur le métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme entier. Un autre aspect de la signalisation des œstrogènes est leur impact sur de nombreux autres systèmes biologiques comme l'immunité ou la reproduction pour n'en citer que deux. Les interactions entre ces trois systèmes augmentent encore plus le niveau de complexité pouvant exister dans la signalisation des œstrogènes, l'immunité influençant le métabolisme énergétique et la reproduction, le métabolisme énergétique influençant l'immunité et la reproduction, et finalement la reproduction influençant le métabolisme énergétique et l'immunité. L'hypothèse de mon projet de thèse s'est inscrite dans ce contexte : la voie E2/ER α a un impact direct sur le métabolisme énergétique cellulaire des adipocytes blancs dans des conditions saines et pathologiques. Les objectifs associés sont donc de combiner des techniques de biologie moléculaire telles que le séquençage des ARN (RNA-seq) et l'immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage (ChIP-seq) pour identifier la voie directe de E2/ER α dans le tissu adipeux blanc. Ces projets ont ainsi permis de déterminer les effets des œstrogènes spécifiques au tissu adipeux blanc dans un contexte sain et physiopathologique ainsi que de soulever de nouvelles questions dont je discuterai après la présentation des résultats obtenus au cours de ces années de doctorat.

Chapitre 2 : ER α governs a specific gene expression program and metabolic function in white adipose tissue.

Résumé en français du chapitre

Le tissu adipeux blanc (WAT) est un système endocrinien majeur qui participe par excrétion d'adipokines, à la régulation de nombreux processus physiologiques, incluant l'homéostasie énergétique, le métabolisme des lipides, la réponse immunitaire et la reproduction. Inversement, les hormones stéroïdiennes comme les œstrogènes, stimulent, maintiennent et contrôlent la distribution des graisses. Chez la femme, le déclin de la synthèse des œstrogènes survenant à la ménopause entraîne une redistribution du stockage des lipides et une augmentation de la masse adipeuse. Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires connectant la reproduction, la signalisation des œstrogènes et le métabolisme des lipides sont encore flous. Pour éclaircir cette zone sombre, cette étude cherche à déterminer les effets moléculaires à court terme des œstrogènes sur le vWAT spécifiquement. Le modèle utilisé est une souris ovariectomisées à laquelle l'on injecte ou non de l'œstradiol. 2h après injection, des expériences de ChIP-seq sur le vWAT ont révélé le recrutement de ER α (estrogen receptor α) à la chromatine proche de gènes impliqués dans la néoglucogenèse, la β -oxydation des lipides, le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons. Ces résultats semblent se répercuter sur le transcriptome puisque 4h après injection, puisque des expériences de RNA-seq ont montré une surexpression de ces gènes. Il est ainsi possible, 8h après injection de confirmer ces résultats sur l'activité de la β -oxydation, du cycle de Krebs et sur la glycolyse. Les œstrogènes semblent ainsi bien avoir un impact direct sur l'expression génique du vWAT, permettant notamment une utilisation accentuée des lipides au dépend du glucose.

Les expériences présentées dans ce chapitre et les résultats qui en découlent ont été tous produits et analysés par le rédacteur de ce manuscrit Martin Morin. La rédaction du chapitre est aussi le fruit de Martin Morin et il est en voie d'être soumis au journal scientifique "*Molecular Endocrinology*".

ER α governs a specific gene expression program and metabolic function in white adipose tissue.

Martin Morin, Stéphanie Bianco and Nicolas Gévry*

Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 2500 boulevard de l'Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

*Corresponding author: nicolas.gevry@usherbrooke.ca

Running Title: ER α regulatory network in vWAT

Word count: 8791

Number of figures: 6 Figures, 7 Supplemental figures, 6 Supplemental tables

Keywords: Estrogen receptor alpha (ER α), white adipose tissue (WAT), estradiol (E2), regulatory elements, energy metabolism.

2.1. Abstract

The white adipose tissue (WAT) has a major influence on energy metabolic functions and expresses a main player in female reproductive functions, the estrogen receptor ER α . However, its direct role in WAT and the possible cross talk between those two systems remain elusive. Ovariectomized mice or mice carrying an ER α knock-out gene (ER α KO), have a higher risk of becoming obese and developing metabolic disorders such as diabetes or dyslipidemia. To identify the direct target genes of ER α in visceral WAT, we treated ovariectomized mice with estradiol (E2) and proceeded to a genome-wide transcriptome profiling combined to the analysis of ER α binding sites. We demonstrate that the E2/ER α pathway increases the expression of genes involved in the balance between lipids and glucose catabolism, the energy expenditure through the TCA cycle and the respiratory membrane chain. This transcriptional program differs from those induced by ER α in subcutaneous WAT, brown adipose tissue, skeletal muscle and liver suggesting a tissue-specificity of E2/ER α actions. Our results are consistent with E2/ER α signaling protecting against metabolic diseases such as obesity by regulating an important gene regulatory network that helps maintaining normal metabolic functions in WAT.

2.2. Introduction

To coordinate reproduction, the mammal female reproductive tissues secrete a range of steroid hormones. More specifically, 17 β -estradiol (E2) is the best characterized hormone that is produced mostly by the ovarian granulosa cells during the first half phase of the menstrual/estrous cycle. E2 can act via two transcription factors (TFs) named estrogen receptors (ERs) ER α and ER β ¹⁻³, and one G-protein-coupled receptor (GPCR) named GPER^{4,5}. ERs modulates gene expression by binding to chromatin at regulatory elements, enhancers and promoters, directly via Estrogen Response Element (ERE) or indirectly via other TFs such as AP-1 and SP-1¹. In recent years, TF-binding to enhancers has emerged as a critical driver of gene expression responsible of cell-identity or cell-response to specific stimuli⁶. The target network of a TF needs to be characterized in order to fully understand its functions in a specific tissue.

ER α is not only expressed in reproductive related tissues, but also in white adipose tissue (WAT) and many other metabolic tissues such as brown adipose tissue (BAT), skeletal muscle and liver⁷. Indeed, reproductive functions require a lot of energy resources and have major effects on the management of cell energy and metabolism^{8,9}. For example, ovariectomized mice or female mice that carry an ER α knock-out gene (ER α KO) become obese and develop metabolic disorders such as diabetes or dyslipidemia^{7,10,11}. Moreover, loss of estrogens production in the *Cyp19a1* aromatase knock-out (ArKO) mice also leads to metabolic disorders similar to those observed in ER α KO mice¹². Importantly, in these mouse models, the increased WAT depots are more related to decreased energy expenditure than to hyperphagia¹², supporting a role of ER α /E2 pathways in WAT, liver or skeletal muscle regulatory functions. In keeping with the effects observed in mice, woman's menopause results in a decline in E2 levels, increased adiposity and metabolic disorders¹³. Although, estrogen replacement therapy (HRT) can help reverse these effects⁷, the mechanisms by which E2 modulates susceptibility to metabolic diseases are not well understood.

It has been previously suggested that the effects of E2 on the transcriptome are mainly tissue specific¹⁴, supporting the idea of an ER α tissue-specific response. In order to better understand the ER α tissue-specific response, a series of ER α KO mice in specific tissues

were developed. Female FERαKO mice, KO for ERα in the fat tissues, gain more weight compared to the WT mice, mostly in fat tissues¹⁵. More precisely, E2 enhances lipolytic response and decreases lipogenic and lipids storage pathways in visceral WAT (vWAT) in ovariectomized mice and menopausal women^{16,17}. In other tissues, E2 decreases also lipogenic gene expression in skeletal muscle and liver¹⁶. Moreover, MERαKO mice, KO for ERα in skeletal muscle tissues, recapitulate the obesity phenotype observed in ERαKO and FERαKO mice¹⁸. On the other hand, LERαKO mice, KO for ERα in liver tissue, do not gain weight compared to WT but show severe decrease of liver insulin sensitivity^{19,20}. The effects of estrogens on metabolic tissues have been mostly studied with long-term stimulation on ovariectomized rodent's WAT or using tissue-specific ERα gene knock-out mice models. One consequence of the long-term estrogen exposure in ovariectomized rodents and ERα knock-out models is that it can lead to indirect actions on fat pads from other tissues like the obesity phenotype of MERαKO mice. Unfortunately, *in vivo* E2 short-term response remains relatively obscure and poorly studied.

The purpose of this study is to investigate the specific pathways targeted by E2 and ERα in vWAT, just a few hours after an E2 stimulation in ovariectomized mice. We first performed a genome-wide analysis of ERα chromatin binding sites in tissues involved in energy metabolism in order to identify the specific network of ERα in vWAT. We next performed the first multi-omics integrative investigation of the landscape of ERα in female vWAT, combining ChIP-seq and RNA-seq experiments. Our data show an early action of E2 stimulation on gene expression involved in energy metabolism that leads us to propose a model for specific action of estrogens and ERα in vWAT.

2.3. Results

2.3.1. ER α tissue-specific binding occurs at distal enhancers

To obtain a global view of the early tissue-specific effects of estrogens on ER α binding in mouse vWAT, we identify by chromatin immuno-precipitation coupled with a sequencing (ChIP-seq) the ER α global chromatin binding sites (BS), or ER α cistrome, induced in response of a short E2-treatment. Ten-weeks old ovariectomized mice were sacrificed after a short-term E2- or placebo-treatment and tissue involved in energy metabolism were collected (Supplemental Figure 1). The ER α BS of perigonadal vWAT, inguinal scWAT, interscapular BAT, quadriceps femoris skeletal muscle, and the liver were then compared with each other in order to identify the tissue-specific ER α cistrome (Figure 1a). We did not detect any association of ER α with the chromatin in skeletal muscle when compared to the other tissues, but we identified 23 458 BS in vWAT, 17 987 BS in scWAT, 5 197 BS in BAT and 21 417 BS in liver (Figure 1a, Supplemental Figure 2). Western blot analysis shows a tissue-specific expression of ER α among these tissues (Supplemental Figure 3) and no full-length 66 kDa isoform of ER α was detected in skeletal muscle, explaining, at least in part, that no ER α seems to bind at chromatin in this particular tissue.

Among the 49 636 ER α BS identify by ChIP-seq in all tissues, only 4 359 of them were common (ER α^{com}) to at least three tissues suggesting a high tissue specificity of ER α binding (Figure 1a). A genomic feature enrichment analysis was performed on ER α^{com} BS and in tissue-specific BS (ER $\alpha^{\text{spe-vWAT}}$, ER $\alpha^{\text{spe-scWAT}}$, ER $\alpha^{\text{spe-BAT}}$ and ER $\alpha^{\text{spe-liver}}$) in order to see in which regulatory elements the tissue-specific binding occur (Figure 1b). This analysis shows that ER α^{com} BS were enriched in promoter regions whereas tissue-specific BS were associated with distal intergenic and intronic regions suggesting that ER α tissue-specific binding occur mainly at distal regulative genomic regions called enhancers.

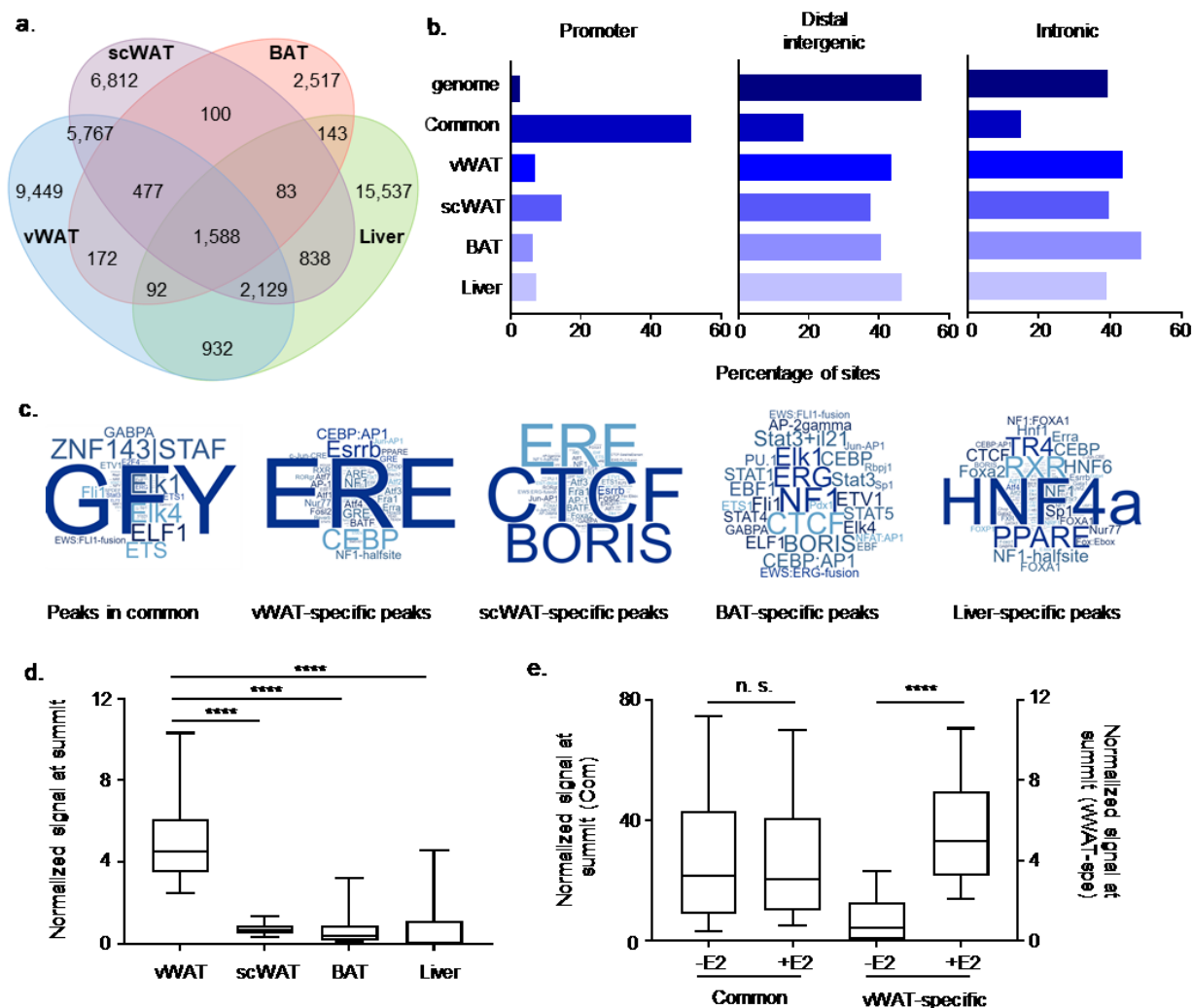


Figure 2.1 : Tissue-specific effects of E2 treatment on the ERα cistrome of tissue involved in energy metabolism. (a) Venn diagram representing the shared and specific ERα binding sites between vWAT (n=4), scWAT (n=3), BAT (n=1) and liver (n=2) from ChIPseq data. (b) The proportion of promoter, distal intergenic and intronic regions are represented for each tissue and for the shared ERα binding site compared to their global proportion in the genome (data shown are in percentage). (c) Motifs found in ERα binding sites for each tissue by the HOMER tool are showed here. The size of each motif's name is representative of the p-value obtained by the HOMER tool representing the enrichment of each motif (a bigger motif name represents a smaller p-value). (d) Normalized ERα ChIP-seq signal at vWAT-specific BS summit between vWAT, scWAT, BAT and liver. Box plots are represented with the 10 and 90 percentiles. (e) Normalized ERα ChIP-seq signal at common and vWAT-specific BS summit between placebo and E2 treatments. Box plots are represented with the 10 and 90 percentiles. P-values were obtained with a Mann-Whitney test (n.s.: non-significant; ****: p-value<0.0001).

We next performed a motif enrichment analysis on those peaks in order to identify putative tissue-specific ER α cofactors (Figure 1c). With no surprises, ER α^{com} BS were enriched in promoter-binding factors motifs. ER $\alpha^{\text{spe-vWAT}}$ BS were associated with estrogen response element (ERE) motif and in a lesser extent with CEBP (CCAAT-enhancer-binding) and ESRR (estrogen related receptor) factors motifs. The enrichment motif analysis of the ER $\alpha^{\text{spe-liver}}$ BS showed an association with HNF4a (hepatocyte nuclear factor) motif but did not detect ERE motifs, indicating that it is most likely that ER α binds the chromatin in an indirect manner in this tissue. In contrast to the results obtained for ER $\alpha^{\text{spe-vWAT}}$ BS, CTCF (CCCTC-Binding Factor) and BORIS (brother of the regulator of imprinted sites or CTCFL) motifs were enriched with ERE motif in ER $\alpha^{\text{spe-scWAT}}$ BS showing other putative cofactors for ER α et scWAT. These new results suggest that ER α tissue-specific binding might probably be due to tissue-specific ER α cofactors.

Since the tissue-specificity of ER α is mainly associated with distal enhancers, we selected 8 781 ER $\alpha^{\text{spe-vWAT}}$ BS that were not associated with promoters (ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS). ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS were next associated with the nearest genes and a gene ontology analysis revealed that the “monocarboxylic acid metabolic process” ontology were enriched (Supplemental Figure 4). More precisely, the genes found in this ontology class are part of the PPAR signaling and the fatty acid degradation pathways (Supplemental Figure 5 to 7). In the same way, we next selected each tissue-specific BS that were not associated with promoters. Conversely to ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS, ER $\alpha^{\text{spe-scWATenh}}$ BS were more associated with genes involved in immune response and inflammation (Supplemental Figure 4). ER $\alpha^{\text{spe-Liverenh}}$ were associated mainly with amino-acid metabolic process, and there is no metabolic-associated gene ontology enrichment in ER $\alpha^{\text{spe-BATenh}}$ BS (Supplemental Figure 4).

Because of its central role in energy and lipid metabolism, for the rest of this study we isolated the ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS from the rest in order to better characterize ER α vWAT-specific pathways (Figure 1a, 1d). ER α were enriched at ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS after E2-treatment in comparison to the placebo-treatment whereas ER α^{com} BS showed no differences (Figure 1e) suggesting that ER α binds promoters before any E2 stimulation conversely to ER $\alpha^{\text{spe-vWATenh}}$ BS enhancer sites.

2.3.2. CEBPB as putative ER α cofactors in vWAT

In order to characterize ER^{spe-vWATenh} BS, in particular the most active one, we then performed a ChIP-seq of the acetylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27ac), a histone mark that is associated with the most active enhancers. We cluster the ER^{spe-vWATenh} BS and found that 4 clusters were formed depending of their H3K27ac signal (Figure 2a and 2b). 5 007 of ER^{spe-vWATenh} BS colocalized with a high H3K27ac signal (Cluster 1 to 3) and 3 774 BS were associated with a low H3K27ac signal (Cluster 4).

A motif enrichment analysis was next performed on these four clusters. A strong enrichment of ERE and CEBP motifs were found in clusters 1 to 3 that are associated with high H3K27ac signal conversely to cluster 4 where nearly no CEBP binding motif was found (Figure 1c). Interestingly, ERE and CEBP motifs are in part mutually exclusive because only 179 of ER^{spe-vWATenh-hH3K27ac} BS have both motifs (Figure 1d) and were enriched preferentially in the centre of the BS. These data suggest that ER α and CEBP factors might be part of the same complex and that this complex might bind through ER α or CEBP. Since ER α often stimulates expression of its cofactors we validated by RT-qPCR the expression of *Cebpa*, *Cebpb* and *Cebp* (Supplemental Figure 7a). *Cebpb* is the only one overexpressed after E2 stimulation in vWAT so we performed a ChIP-qPCR on ER α BS containing a CEBP and/or a ERE motif and found that CEBPB is enriched at all tested ER α BS supporting the idea of CEBPB as a part of ER α complex (Supplemental Figure 7b).

In short, CEBPB seems to act like a cofactor of ER α in the most active BS. Now that vWAT-specific ER α BS are well characterized, we have to identify the effects of vWAT-specific E2/ER α cistrome on gene expression.

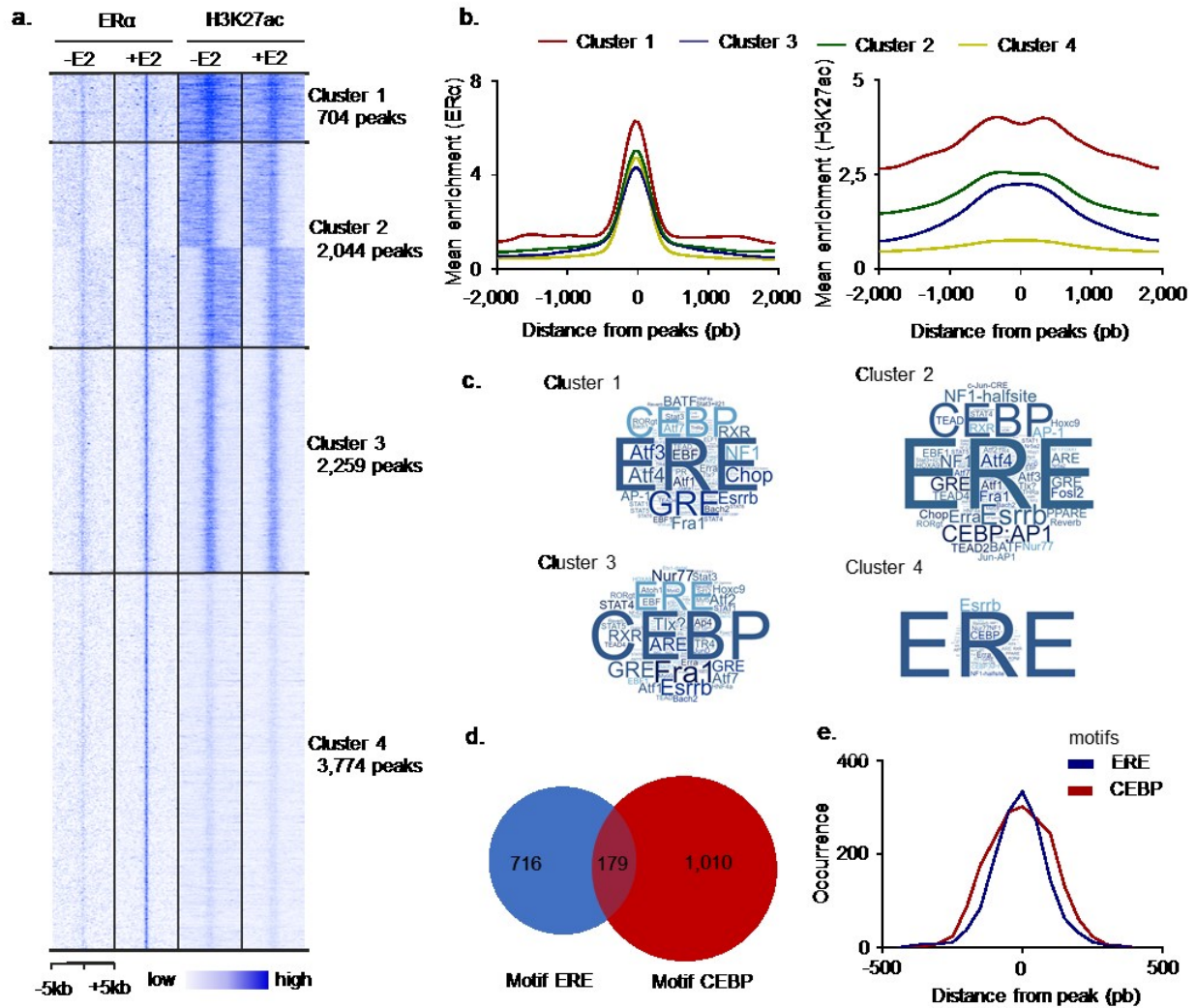


Figure 2.2 : CEBPB is associated with ERα at vWAT-specific ERα binding site. (a) Heatmap representing the clustering of the ERα and H3K27ac ChIP-seq data coverage in placebo or E2 treated vWAT at ERα^{spevWATenh} BS. The strength of ERα binding and H3K27ac coverage are represented with the strength of the blue color on -/+ 5kb from ERα^{spevWATenh} BS summits. (b) Mean ERα and H3K27ac ChIP-seq signal for the four clusters found in 2a at -/+ 2kb from ERα^{spevWATenh} BS summits. (c) Motifs found in ERα binding sites for each cluster by the HOMER tool are showed here. The size of each motif's name is representative of the p-value obtained by the HOMER tool representing the enrichment of each motif (a bigger motif name represents a smaller p-value). (d) Venn diagram representing the ERE and CEBP motif found at ERα^{spevWATenh}-hH3K27ac BS. (e) Distance from ERα^{spevWATenh}-hH3K27ac BS of ERE and CEBP motifs.

2.3.3. ER α and E2 target genes that are involved in metabolic pathways

In order to identify E2 target genes, we performed RNA sequencing (RNA-seq) experiments on E2- and placebo-treated vWAT. RNA-seq revealed 393 up-regulated and 238 down-regulated genes in E2-treated sample compared with placebo (Figure 3a). These up- and down-regulated genes were found mainly involved in oxidative phosphorylation, TCA cycle and cofactor metabolic process (Supplemental Figure 8).

Most of these enriched ontology class are composed of genes that are upregulated in E2-treated vWAT (Figure 3b, Supplemental Figure 9). For instance, three acyl-CoA dehydrogenases (*Acadm*, *Acadl* and *Acadvl*) and two hydroxyacyl-CoA dehydrogenases (*Hadh* and *Hadhb*), were upregulated after E2 treatment suggesting an increase of the first and third steps of lipids β -oxidation in vWAT (Figure 3b and Supplemental Figure 10). We also observed an up-regulation of the *Pdk4* gene, one of the most regulated and studied pyruvate dehydrogenase kinases (Pdk) (Figure 3b, Supplemental Figure 9), which are proteins that phosphorylate the pyruvate dehydrogenase complex in order to inhibit the transition between glycolysis and the TCA cycle. In keeping with these results, we observed an up-regulation of the NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenases *Idh3a* and *Idh3b* (Figure 3b, Supplemental Figure 9), that perform a key step of the TCA cycle. We also detected an up-regulation of *Aco2* expression, another E2 target that belongs to the TCA cycle. Our results also suggest an increase of energy expenditure because many electron transport chain genes, notably *Ucp1* and *Cox7a1* were found upregulated after E2 treatment (Figure 3b, Supplemental Figure 9). *Ucp1* and *Cox7a1* are well-known markers of brown/beige adipose tissue suggesting that a short-term E2 treatment induce a beiging of vWAT (Supplemental Figure 10).

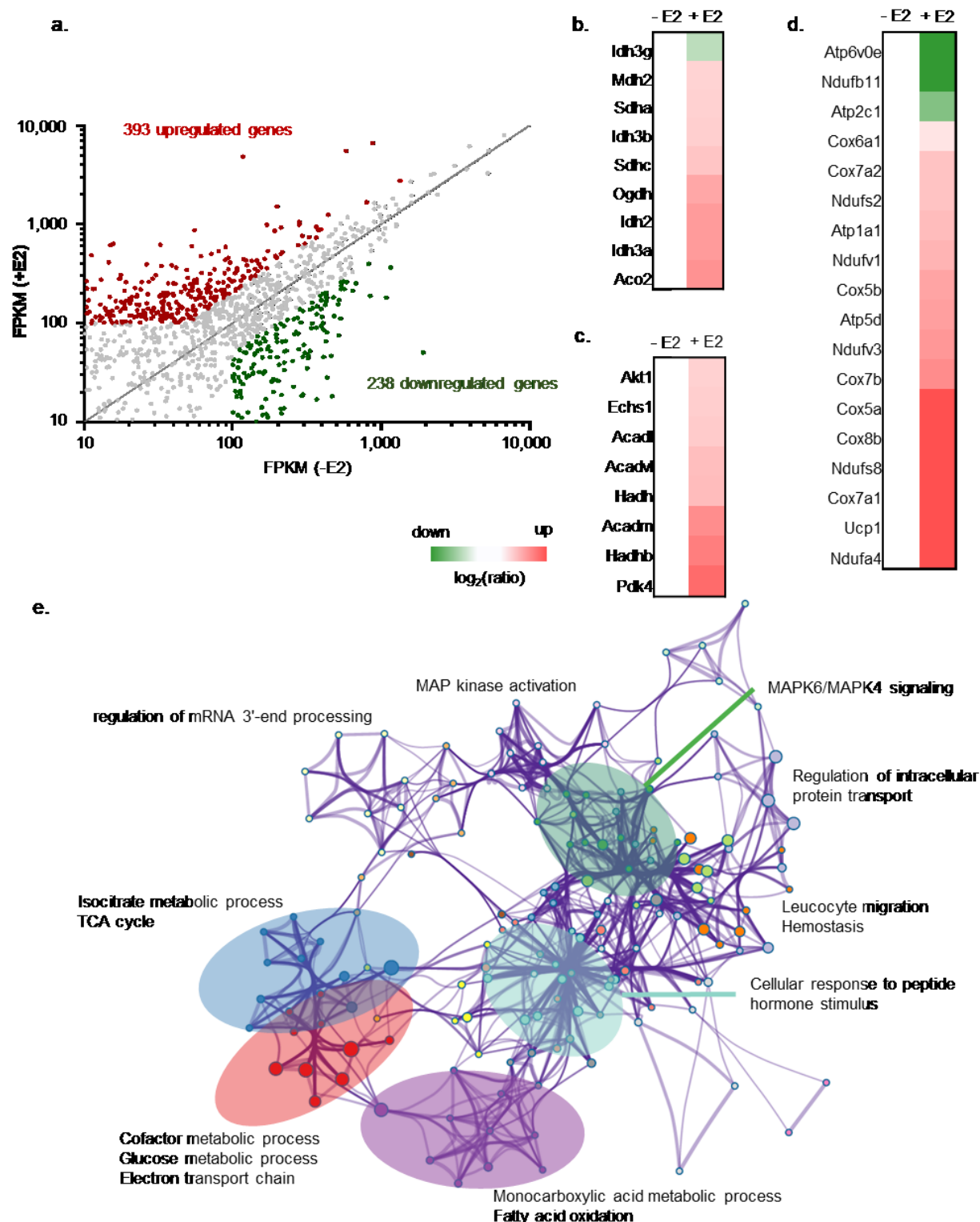


Figure 2.3 : ER α and E2 affect the expression of genes that are involved in metabolic pathways. (a) From the RNA-seq experiments, each gene is associated with an expression value (FPKM) in placebo (n=4) and E2 treated (n=3) samples. FPKM value revealed 393 upregulated genes and 238 downregulated genes after E2 treatment

compared to placebo. (b-d) heatmaps illustrated the relative expression of genes involved in the TCA cycle (b), lipids metabolism (c) and the electron transport chain (d). (e) Network of the gene classes enriched in E2-upregulated and that are associated with ER α ^{spevWATenh-hH3K27ac} BS.

We next integrated the ChIP-seq and the RNA-seq data by combining the genes that are up-regulated by the E2-treatment in vWAT with the ER^{spe-vWATenh-hH3K27ac} BS and found 106 genes in that condition. As the RNA-seq, ontology terms enrichment analysis of these genes revealed alone that many are implicated in metabolic pathways, including those involving lipids oxidation, TCA cycle or ATP metabolic process in general (Figure 3c). Together, all these data suggest that E2 and ER α pathway can affect the balance between glucose and lipids as energy sources, tilting the balance in the favor of lipids over glucose in vWAT. Our data also suggest that E2 and ER α affect energy expenditure by targeting the TCA cycle and the respiratory electron membrane chain and by a beiging of vWAT.

2.3.4. E2/ER α decreases PDH activity and stimulates acyl-coA dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase activities form β -oxidation and TCA cycle in vWAT

Since our genomic integrative analysis identified several E2/ER α targets involved in energy metabolism and homeostasis (Figure 4a), we further evaluated the impact of E2 signaling on the enzymatic activity associated with the genes involved in metabolic functions in vWAT. Glucose is used to produce pyruvate that can be converted in acetyl-CoA by the PDH complex during glycolysis. The increase in *Pdk4* expression we previously observed led us to test whether PDH activity was inhibited. As expected, using an enzymatic assay we observed a reduction of 20% of PDH activity 8 hours after E2 treatment when compared to the placebo (Figure 4b).

β -oxidation of lipids constitutes a second major pathway in cellular energy metabolism for producing acetyl-CoA. Interestingly, we observed an increase in gene expression of three acyl-CoA dehydrogenases and two hydroxyacyl-CoA dehydrogenases. Consequently, we measured the acyl-CoA dehydrogenase enzymatic activity using the long chain palmitoyl-CoA and the medium chain octanoyl-CoA. For both substrates, we observed that the acyl-

CoA dehydrogenase activity was increased by 160% for palmitoyl-CoA as substrate and 36% for octanoyl-CoA as substrate 8 hours after E2 treatment (Figure 4d).

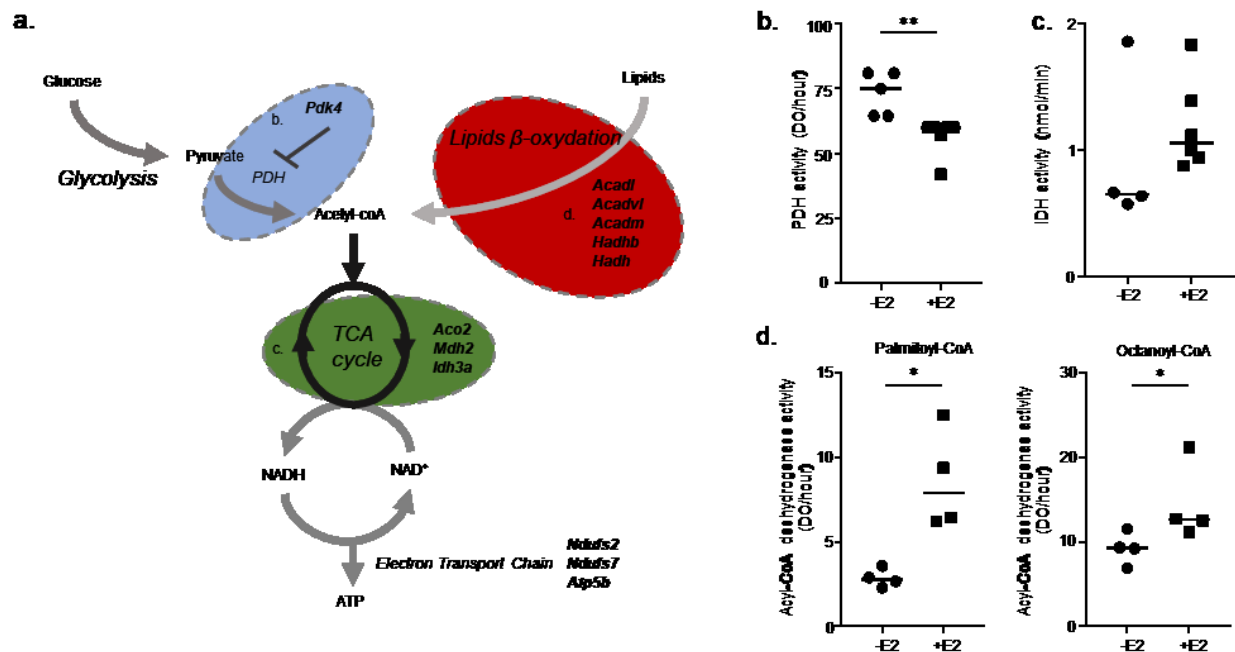


Figure 2.4 : Impact of E2 treatment on activity of enzymes involved in energy metabolism in vWAT. (a) Schematic representation of E2/ERα target genes and their involvement in lipids/glucose balance and in energy expenditure. (b) PDH activity were tested in placebo and E2 treated vWAT samples (placebo n=5, E2 n=5). (c) NAD⁺ dependent IDH activity in placebo and E2 treated vWAT samples by colorimetric assay, data represents the speed of isocitrate conversion by NAD⁺ IDH in nmol of isocitrate converted/min. The full bars correspond to the median of each group E2 treatment decreases NAD⁺ dependant IDH activity in vWAT (placebo n=4, E2 n=6). (d) Acyl-CoA dehydrogenase activities were tested in placebo and E2 treated vWAT samples on a long chain acyl-CoA E2 treatment decreases palmitoyl-CoA (C16 carbons) and a medium chain acyl-CoA octanoyl-CoA (C8 carbons) degradation activities in vWAT (placebo n=4, E2 n=4). P-values were obtained with a Mann-Whitney test (*p-value<0.05; **p-value<0.005).

Acetyl-CoA is used by the TCA cycle to produce NADH that can be used by the electron transport chain (Figure 4a). Since our results showed an increase in the expression levels of *Idh3a*, *Aco2*, and *Mdh2*, three important enzymes involved in the TCA cycle, we tested the enzymatic activity of NAD⁺ isocitrate dehydrogenase, a rate-limiting step in the TCA

cycle²¹. Interestingly, we observed an increase of 62% of enzymatic activity of NAD⁺ isocitrate dehydrogenase 8 hours after E2 treatment of vWAT.

The enzymatic activities of the PDH complex, the acyl-CoA carboxylases and the NAD⁺ dependant isocitrate dehydrogenases we measured are consistent with the increase in expression levels of their cognate genes identified by our integrative analysis of E2/ER α genomic regulation and provide new insights into E2/ER α specific impact on the energy metabolism in vWAT.

2.4. Discussion

The involvement of E2 and ER α in the energy metabolism of mammals has been previously reported and was established with long-term E2 treatments of whole animals or non-conditional tissue specific knock-out mice models^{7,11}. The effects observed under those conditions are likely the result of both direct short-term and indirect long-term effects that can hardly be distinguished. Here, we explored the binding of ER α in multiple tissues involved in energy metabolism after a short-term E2 injection in order to identify direct targets of ER α in those tissues.

Few studies report the tissue-specificity of ER α BS and E2 gene expression program as much in reproductive tissues as metabolic tissues^{14,22}. Genes associated with the specific ER α network of vWAT are involved mainly in lipids oxidation, PPAR signaling and energy expenditure that can be linked to the known protective effect of E2 against obesity. In FERKO mice, the absence of ER α in vWAT tissue might causes obesity because of an inactivation of these pathways¹⁵. Interestingly, scWAT-specific ER α BS are more associated with inflammatory response, notably with genes like *Jak2*, *Stat5a* and *Stat5b*. Inflammation and more particularly the JAK/STAT pathway are often associated with obesity and with the insulin pathway via the SOCS proteins^{23–25} and ovariectomy is known to increase adipose tissue inflammation²⁶. The protective effect of ER α in scWAT may be due to a decrease in inflammatory response. There is no obvious GO enriched in BAT, but we can however notice some genes involved in the uncoupling of the electron transport chain *Ucp2* and *Ucp3*, a major pathway in BAT energy expenditure and with the insulin response *Insr* and *Irs4*. This is consistent with the previous reports suggesting that

E2 increase the thermogenic potential of BAT^{27,28}. Conversely, liver-specific ER α binding occurs near genes involved in amino acid metabolic process. It was shown in previous studies that amino acids are able to activate hepatic ER α and that amino acid catabolism is ER α dependant and a major discriminant between male and female^{9,19}. Our data confirmed here at a cistrome level what were observed at transcriptomic and metabolomic levels in these previous studies. We ask if the tissue-specificity found in ER α binding here might be explained by changes in epigenetic marks, in ER α binding partners or in ER α isoforms expression between tissues²⁹⁻³¹.

First, we found that the few similarities occurred in ER α binding between vWAT, scWAT, liver and BAT were found at promoter regions and that the tissue-specific ER α BS occurs mainly at intronic and distal intergenic enhancer regions. Consistent with these results, epigenetic marks associated with promoter like H3K4me3 were reported to be relatively well conserved between tissues²⁹, however epigenetic marks like H3K4me1 and H3K27ac that are enriched at enhancers are in a large part tissue-specific²⁹. We suggest that tissue-specific ER α binding is, at least in part, dictated by these marks and thus by the global closed/opened chromatin state at enhancers in each tissue.

Secondly, our data clearly indicates that ER α have tissue-specific binding partners like CEBP that is detected as an interactor of ER α only in vWAT tissue, whereas CTCF and HNF4a seems to be ER α tissue-specific partners in scWAT and liver respectively. Members of the CEBP family were previously shown to be essential for WAT transcriptional program as an interactor of the nuclear receptor PPARG³², a master regulator of adipogenesis, supporting our hypothesis of CEBP as a coregulator of ER α in vWAT. Our results suggest that CEBPB may be part of the ER α complex. Moreover, ER α binding seems occur either directly or interestingly, via CEBPB in the most active vWAT-specific enhancers. Together, these results are consistent with a role for ER α binding partners in the differential E2 response observed between tissues and are in keeping with previous reports^{22,33,34}.

Thirdly, using western blotting, we observed that different ER α isoforms were expressed depending on the tissue examined. It has been previously reported that the human ER α well-studied MCF7 cell line expresses multiple ER α isoforms from 36kDa to the 66kDa

full-length isoform and that the expression of many other isoforms depends on the cell lines analyzed^{35,36}. ER α isoforms diversity is mainly due to a potential deletion of ER α interaction domains AF1 or AF2 leading to different activities and localizations compared with the full-length isoform of ER α ^{37–40}. Our results show that ER α isoforms expressed in different tissues vary leading to tissue-specificity on gene expression modulation. Full-length ER α is more present in the nucleus, but 36kDa and 46 kDa well-known isoforms are in large part present at the plasma membrane or cytoplasm performing non-genomic actions of estrogens^{40,41}, explaining that no ER α were found at chromatin in our data. Moreover, multiple studies found that skeletal muscle ER α seems to have mainly non-genomic action compared to other tissues^{42–44}. Therefore, the differential expression of ER α isoforms and the interplay between their homo and hetero-dimerization could also contribute, at least in part, to the ER α binding and estrogen-dependent gene expression observed between tissues.

We next characterized the activation of the specific E2/ER α pathway in vWAT to establish the direct molecular effects of ER α within hours of E2 treatment. Our integrative analysis using genomic and transcriptomic data provides for the first time an extensive identification of genes specifically regulated by ER α in vWAT. We have found an effect of E2 and ER α on the expression of genes involved in cellular energy expenditure and more specifically in lipids oxidation, glycolysis, TCA cycle and the electron transport chain. Our data suggest that the E2/ER α pathway can affect the balance between glucose and lipids as energy sources, tilting the balance in the favor of lipids oxidation (*Acadm*, *Acadl*, *Hadhb*...) over glucose (*Pdk4*) in vWAT, in accordance with an anti-obesogenic effect of E2. Interestingly, a similar outcome on energy metabolism balance with the same genes was previously reported about the effect of physical exercise in skeletal muscle and liver^{45,46}. The E2/ER α pathway affects also energy expenditure by enhancing the isocitrate dehydrogenase activity (*Idh3a*, *Idh3b* and *Idh3g*), the rate-limiting key step of the TCA cycle²¹, and by uncoupling the electron transport chain (*Ucp1*). Several brown/beige adipose tissue-specific genes are E2/ER α direct targets in our results suggesting that beiging of vWAT may occur only hours within E2 treatment and without any cold exposure. E2 were already shown to affect beiging of vWAT⁴⁷, but here we link directly beige/brown-specific genes expression with ER α activation. Together, these results clearly identify lipid

oxidation, energy expenditure and being of vWAT as direct vWAT-specific targets of the E2/ER α pathway.

Menopause is associated with E2 decrease linked with an increase in obesity and metabolic pathology prevalence⁷. Since obesity is a disbalancing between energy uptake and expenditure, our data suggest that E2 and ER α in vWAT improve lipid oxidation and energy expenditure and thus limiting the development of such disease. We propose that the vWAT-specific ER α network can be pharmacologically target in order to counteract or prevent obesity.

Our results were obtained in a mouse model and further studies are needed to demonstrate that a similar E2/ER α regulatory network is also functional in vWAT in other mammals, including humans. Considering that impaired signalling in the E2/ER α pathway affects the metabolism in humans and rodents in a similar fashion, the results presented here provides sufficient evidence on energy metabolism and homeostasis in vWAT to extend them to other animals and humans. Moreover, our data now strongly support the important role of the E2/ER α signalling pathway to protect directly against metabolic diseases such as obesity by regulating an important gene network that helps maintain normal metabolic functions in vWAT.

2.5. Material and methods

2.5.1. Animal preparation

8-weeks old CD-1 female mice were purchased from Charles Rivers Laboratories. Animals were housed in a temperature-controlled room with a light/darkness cycle of 12 hours. Water and standard food were available *ad libitum*. Two weeks after surgery, bilaterally ovariectomized mice received a subcutaneous injection of E2 (E2758, Sigma Aldrich) diluted in mineral oil and 10% ethanol (250ng/0.1mL). Control mice received a placebo subcutaneous injection of the vehicle only. Animals were sacrificed 2, 4 or 8 hours

after E2 injection according to the following schedule: 2 hours for ChIP experiments, 4 hours for RNA experiments and 8 hours for protein enzymatic activity experiments.

2.5.2. RNAseq and RT-qPCR analysis

RNA from vWAT was extracted with the direct-zol RNA Miniprep kit (R2052, Zymo Research) 4 hours after E2 or placebo injections. Purified RNA (300 ng) was reverse-transcribed into cDNA using the M-MLV reverse transcriptase (P7040L Enzymatics Inc). Relative RNA expression levels of all the tested genes were calculated after normalization to *Tbp* and *Rplp0* levels using a C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad). Primers used in this study are listed in Supplemental Table 5

RNAseq libraries were produced with RNA extracted from vWAT tissues essentially as previously described⁴⁸. Normalized expression data were obtained using the RNAseq muggic pipeline from McGill University (<https://bitbucket.org/muggic/muggic>) with mm10 genome assembly. Expression analysis was performed on medium and highly expressed genes (cut-off with FPKM > 100). Gene annotation enrichment was obtained using metascape website (<http://metascape.org>).

2.5.3. Chromatin Immunoprecipitation

ChIP experiments were performed essentially as previously described⁴⁹, except for the use of magnetic dynabeads for immunoprecipitations (10002D, Invitrogen). Tissues were minced and crosslinked in PBS with 1.1% formaldehyde for 12 min at 37°C under agitation. Crosslink is stop by adding 0.125 M of glycine and incubate for 10 min at 37°C under agitation. After two washes with cold PBS, crosslinked tissues were grinded in buffer I (0.25% triton, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10 mM HEPES) using a dounce homogenizer. Samples were next centrifuged for 6 min at 3000 rpm. Buffer I was carefully removed without disturbing the nuclei pellet. Nuclei were next resuspended in buffer II (200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES), and centrifuged for 6 min at 3000 rpm. The pelleted nuclei were then homogenized in SDS lysis buffer (1%SDS, 10

mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.1). Buffers I and II and SDS lysis buffer were supplemented with 1 mM PMSF (PMS123, BioShop Canada Inc), 1 µg/mL of aprotinin (APR600, BioShop Canada Inc), 1 µg/mL of leupeptin (LEU001, BioShop Canada Inc) and 1 µg/mL of pepstatin A (PEP605, BioShop Canada Inc). Four µg of antibody was used for ERα (sc543, Santa Cruz Biotechnology) or H3K27ac (ab4729, Abcam Inc) ChIP. qPCR assays were performed on immunoprecipitated DNA and quantified with a standard curve derived from total DNA (input). Primers used in this study are listed in Supplemental Table 5.

ChIPseq libraries were produced as previously described⁵⁰. Trimmed ChIPseq raw data were aligned to mm10 assembly using bwa tool v0.7.12. Only sequences that mapped once to the genome with a mapping quality score >10 were further analysed. Peaks were called by MACS tool v2.1.0 using a threshold p-value of 0.0025. ERα binding sites were clustered with seqMINER v1.3.3 with the standard parameter⁵¹. Mean distributions of each clusters were obtained using VAP v1.1.0⁵². Genomic features distribution were established using CEAS v 1.0.2⁵³. Motifs enrichment analysis and conversion from bam to bigwig files were performed using HOMER tool v4.7⁵⁴. Visualization of bigwig files was obtained using the UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu>).

2.5.4. Tissue protein extraction and immunoblotting

vWAT, scWAT, skeletal muscle, liver, BAT and heart were harvested from non-ovariectomized mice. Tissues were cut in small pieces of 2 to 4 mm of diameter in buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1mM PMSF and protease inhibitor cocktail). Minced tissues were next crushed using a Dounce homogenizer and incubated on ice for 30 min. NP40 was added to a final concentration of 0.5%, and samples were vortexed for 10 sec, and centrifuged for 30 sec (18 000 g). Supernatants were discarded, and pellets resuspended in buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF and protease inhibitor cocktail [pH 8]). Samples were maintained under agitation at 4°C for 30 min, then centrifuged for 5 min (12 000 g) and protein concentrations were determined by a Bradford assay (#5000006, Bio-Rad). For western blot analyses, 20 µg of each tissue protein extract was separated

by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Primary antibody incubation was performed using the anti-ER α antibody (sc-543, Santa Cruz Biotechnology) at a 1:200 dilution. Secondary antibody incubation was performed using an anti-rabbit antibody (NA943, GE Healthcare) at a 1:10000 dilution.

2.5.5. Pyruvate dehydrogenase activity assay

PDH dehydrogenase activity was measured using the pyruvate dehydrogenase (PDH) enzyme activity microplate assay kit (ab109902) from Abcam Inc according to the manufacturer's protocol.

2.5.6. Isocitrate dehydrogenase activity assay

The IDH activity assay kit from Sigma (MAK062) was used according to the manufacturer's protocol to measure the enzymatic activity of NAD⁺ isocitrate dehydrogenases.

2.5.7. Acyl-CoA dehydrogenase activity assay

The Acyl-CoA dehydrogenase enzymatic activity assays were performed on palmitoyl-CoA (16 carbons) and octanoyl-CoA (8 carbons) substrates as previously described^{55,56}. vWAT samples were harvested 8 hours after E2 or placebo treatment, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. For the analysis, tissues were cut in small pieces and crushed with a Dounce homogenizer in lysis buffer (100 nM sodium sulfate, 0.1 mM EDTA, 0.1% triton X-100). Lysate were sonicated for 10 sec at an amplitude of 20% (Branson Digital Sonifier). Samples were centrifuged 15 min (15 000 g) and protein concentrations were measured by Bradford assay (#5000006, Bio-Rad). Samples protein concentrations were equilibrated at 1 mg/mL of proteins with lysis buffer. The reaction mixture was

composed of the reaction buffer (PBS 1X, 0.2 mM ferricenium hexafluorophosphate, 0.5 mM N-ethylmaleimide, 0.1 mM EDTA, 0.1% triton X-100) and 100 µg of protein from sample homogenates. After 2 min of pre-incubation, reactions were initiated by addition of octanoyl-CoA, palmitoyl-CoA or water as a control. The acyl-CoA esters were added at a final concentration of 0.5 mM and 300 nm absorbance was monitored on a Biotech synergy HT device for 10 min at 37°C.

2.5.8. GEO accession number

All genomic data in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE121691.

2.6. Acknowledgements

We are grateful to C. Nadeau for the helpful work and the good care of mice during manipulations at the animal house. We also thank Mylène Brunelle and Alain Lavigueur for critically reading the manuscript. This work was supported by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to NG (RGPIN-2014-05556). NG holds a Chercheur boursier (senior) award from the Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS).

2.7. Author contributions

M.M. conceived and performed the *in vivo* studies, ChIP experiments, RNAseq/ChIPseq library and analysis, qPCRs, biochemical assays and also wrote and revised the manuscript. SB contributed to the conception and the revision of the manuscript. NG conceived and supervised the project and also wrote and revised the manuscript.

2.8. Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

2.9. Supplemental figure legends

Supplemental Figure 2.1: Quantification of estrogens in mouse serum after estradiol or placebo injection. Estrogens amounts quantified by ELISA are shown for estradiol- and placebo- treated mice in pg/mL of serum 2 hours (a) and 4 hours (b) after injection (+/- SEM, n=4 for placebo, n=5 for estradiol; *p-value<0.05 with MWW test).

Supplemental Figure 2.2: ER α is recruited near genes known to impact lipid metabolism. Coverage of ER α ChIP-seq coverage near Ppara, Ppargc1b and Pdk4 in vWAT, scWAT, BAT and Liver.

Supplemental Figure 2.3: ER α is differently expressed in tissues involved energy metabolism. (a) Western blot of ER α in vWAT, scWAT, BAT, skeletal muscle and liver. ICI is known to induce the degradation of ER α . (b) Western blot of ACTB in the same tissue as a protein loading control.

Supplemental Figure 2.4: ER α binding is tissue-specific. Top6 gene ontology (GO) terms enriched in genes near ER $\alpha^{\text{spevWATenh}}$ (a), ER $\alpha^{\text{spescWATenh}}$ (b), ER $\alpha^{\text{speBATenh}}$ (c) and ER $\alpha^{\text{speliverenh}}$ (d).

Supplemental Figure 2.5: Genes near ER $\alpha^{\text{spevWATenh}}$ BS are involved in PPAR signaling pathway. Representation of the PPAR signaling pathway from KEGG pathway. All genes near a ER $\alpha^{\text{spevWATenh}}$ BS are represented with a star.

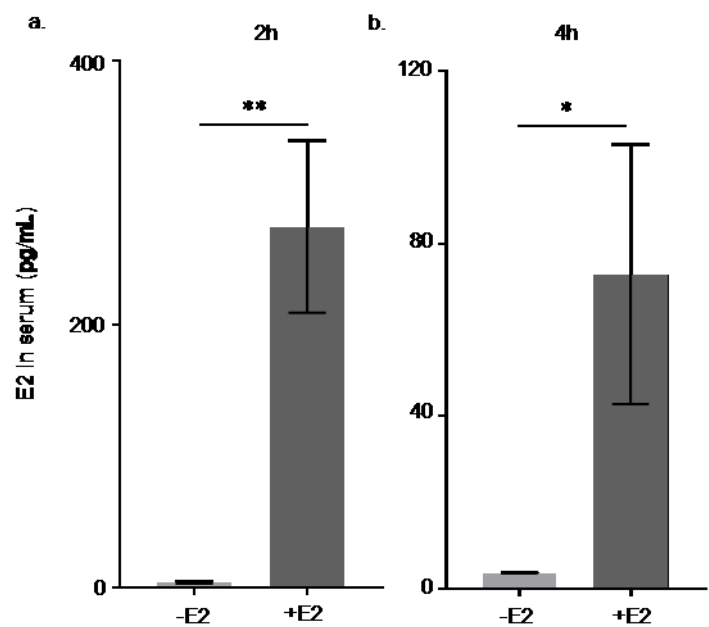
Supplemental Figure 2.6: Genes near ER $\alpha^{\text{spevWATenh}}$ BS are involved in the fatty acid degradation pathway. Representation of the fatty acid degradation pathway from KEGG pathway. All genes near a ER $\alpha^{\text{spevWATenh}}$ BS are represented with a star.

Supplemental Figure 2.7: CEBPB is associated with ER α at ER $\alpha^{\text{spevWATenh-hH3K27ac}}$ BS in vWAT. (a) RT-qPCR normalized expression of *Cebpa* in vWAT in placebo- and E2-treated vWAT. P_values were obtained with a Mann-Whitney test (*p-value<0.05; **p-value<0.005). (b) ChIP-qPCR of CEBPB at ER $\alpha^{\text{spevWATenh-hH3K27ac}}$ BS that contain or not a ERE, a CEBP motif or a combination of the two. P_values were obtained with a Mann-Whitney test (*p-value<0.05; **p-value<0.005).

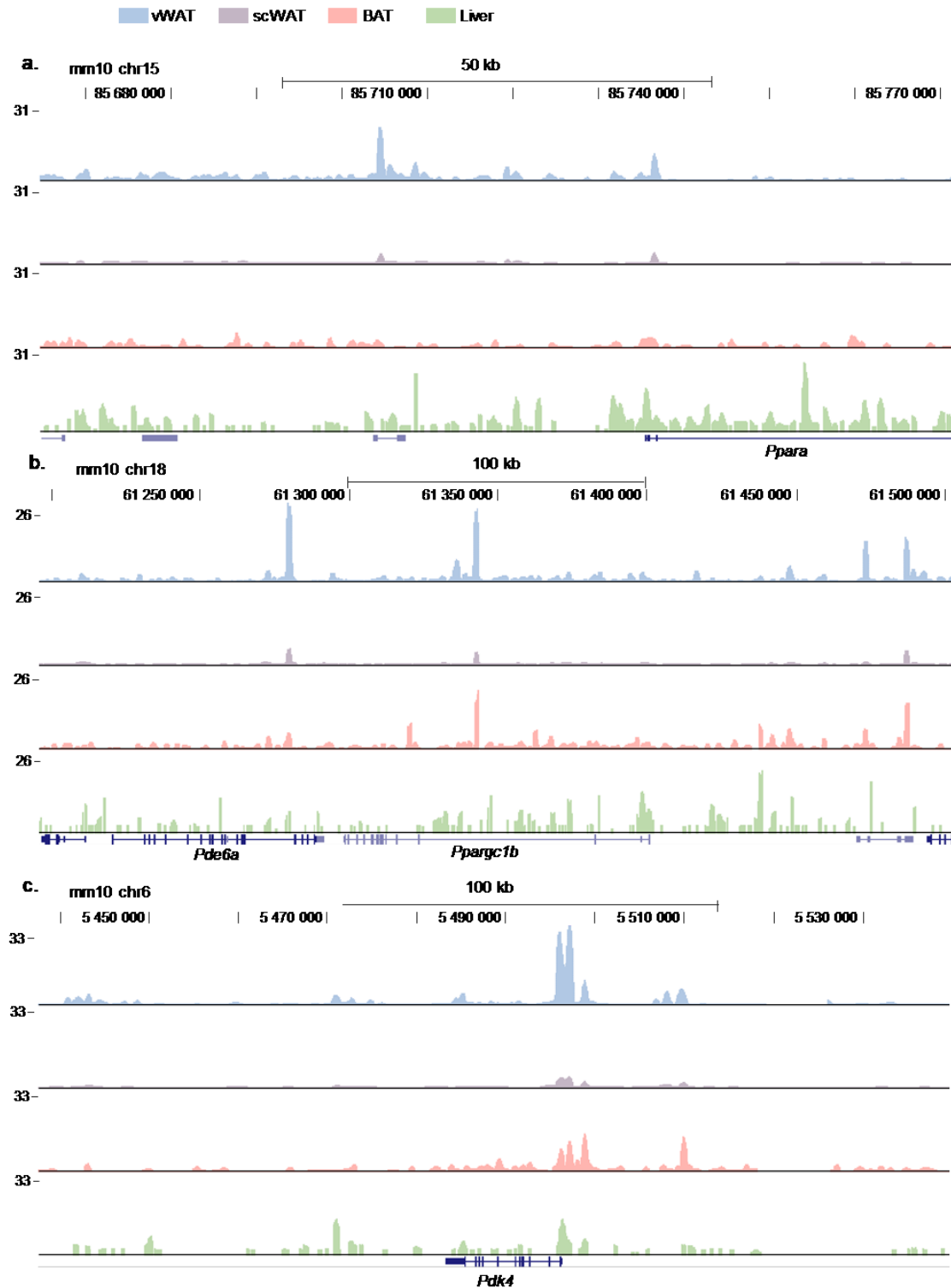
Supplemental Figure 2.8: E2 treatment affect the expression of genes involved in lipid metabolism and energy expenditure. Top10 gene ontology (GO) terms enriched in genes that found up- or down-regulated in vWAT after E2-treatment by RNA-seq.

Supplemental Figure 2.9: Validation by RT-qPCR of E2-target gene found by RNA-seq in vWAT. (a-e) Detail of RT-qPCR validation of E2 target gene found by RNAseq in vWAT. Results are normalized on *Rplp0* and *Tbp* gene expression and represented in log2 of the ratio between E2 treated (n=4) and placebo (n=4) sample data (+/- SEM). (a) *Pgr* represents a positive control of E2 treatment. P_values were obtained with a Mann-Whitney test (*p-value<0.05; **p-value<0.005).

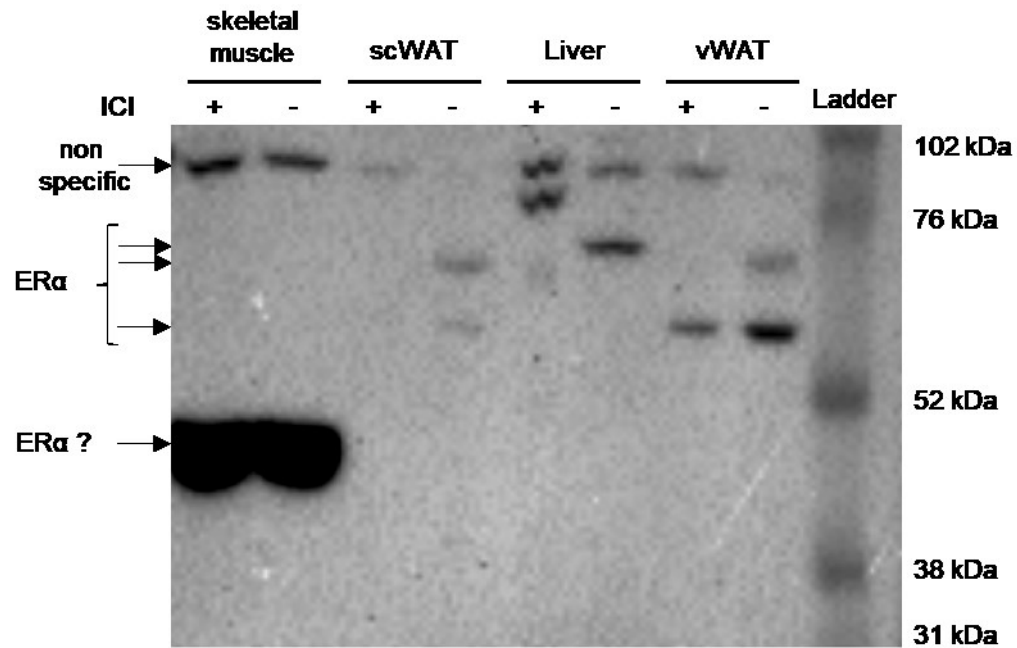
2.10. Supplemental figures



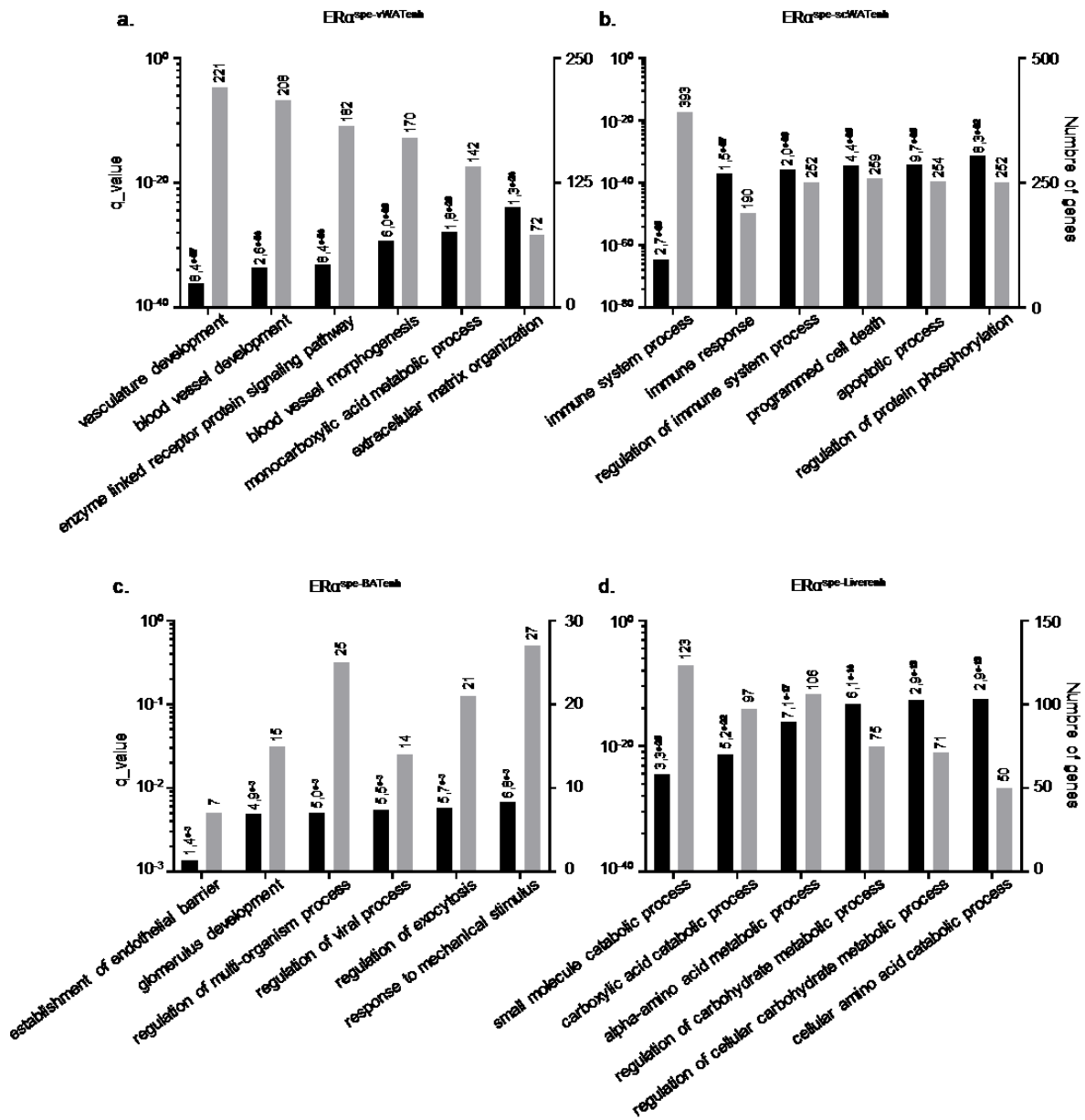
Supplemental Figure 2.1 : Quantification of estrogens in mouse serum after estradiol or placebo injection.



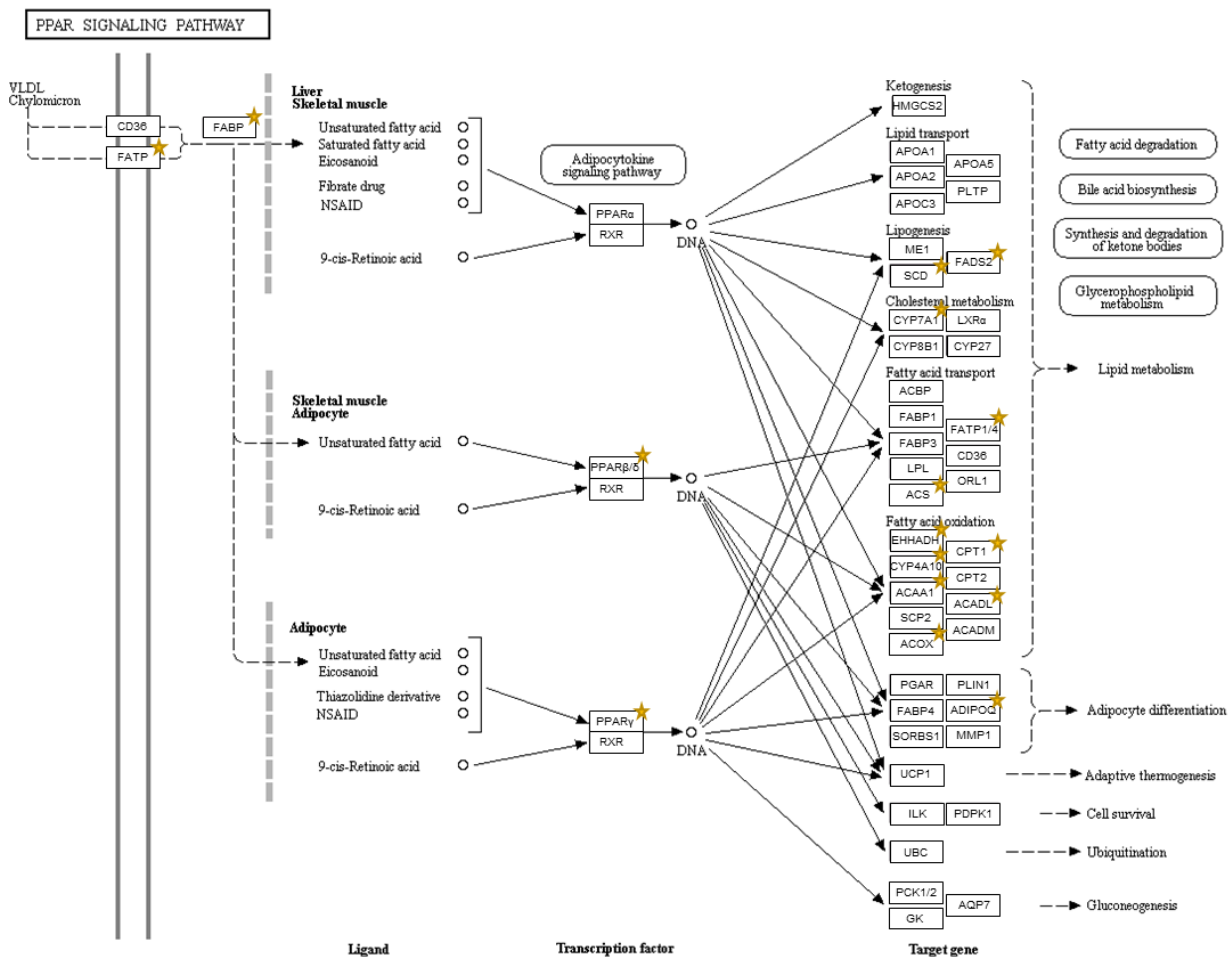
Supplemental Figure 2.2 : E α is recruited near genes known to impact lipid metabolism.



Supplemental Figure 2.3 : ERα is differently expressed in tissues involved energy metabolism.

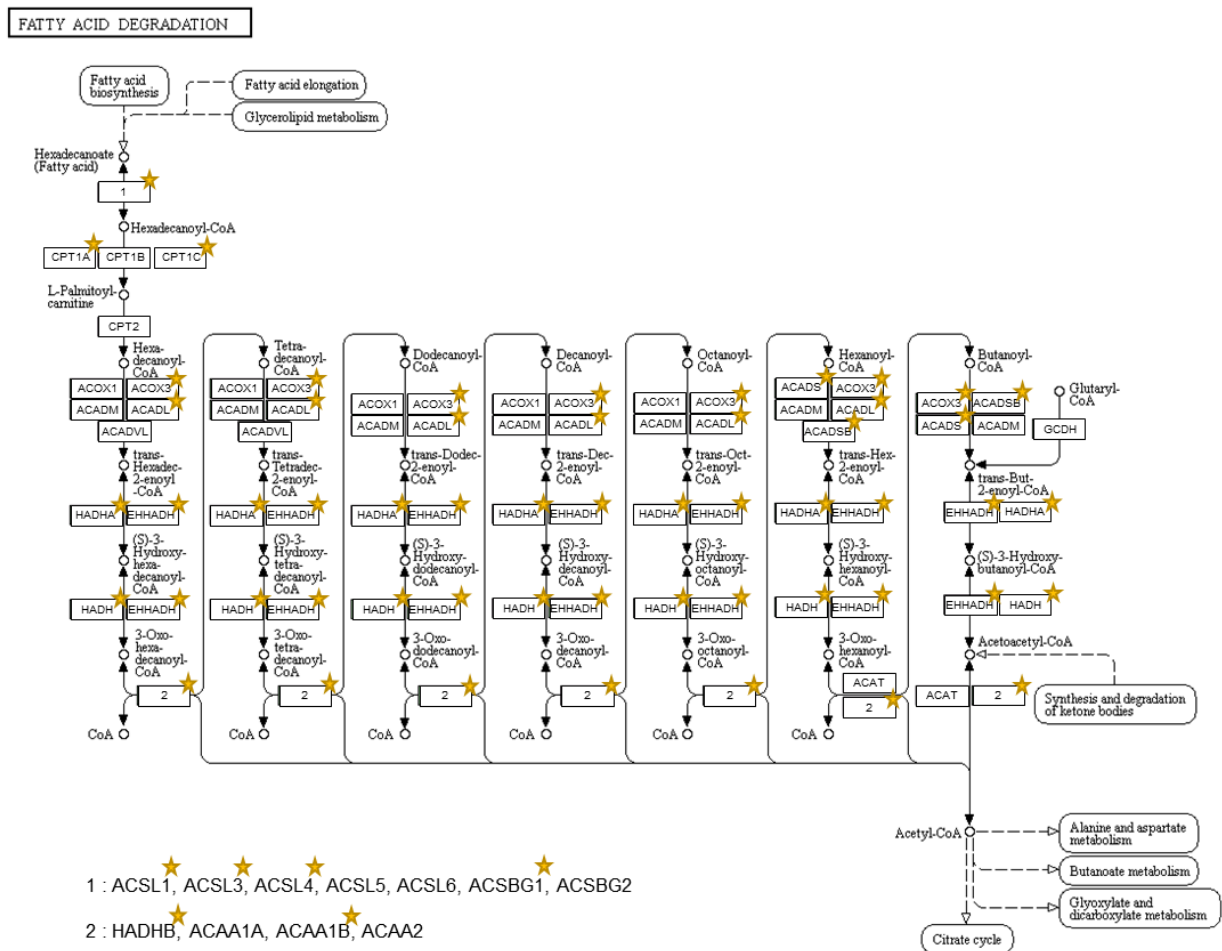


Supplemental Figure 2.4 : ERα binding is tissue-specific.

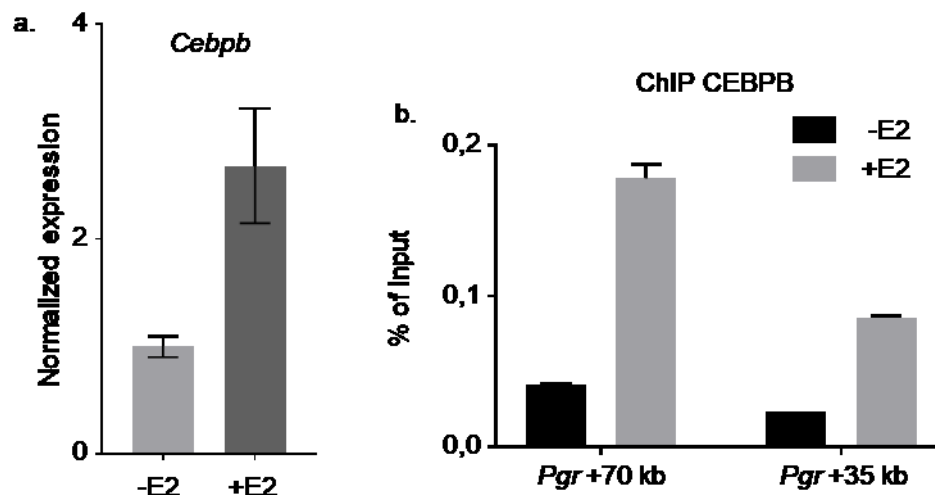


FATP : SLC27A1, SLC27A2, SLC27A4, SLC27A5, SLC27A6
 FABP : FABP1, FABP2, FABP3, FABP4, FABP5, FABP6, FABP7
 RXR : RXRA, RXRB, RXRG
 SCD : SCD1, SCD2, SCD3, SCD4
 ACS : ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5, ACSL6, ACSBG1, ACSBG2
 CPT1 : CPT1A, CPT1B, CPT1C
 ACOX : ACOX1, ACOX2, ACOX3
 MMP1 : MMP1A, MMP1B

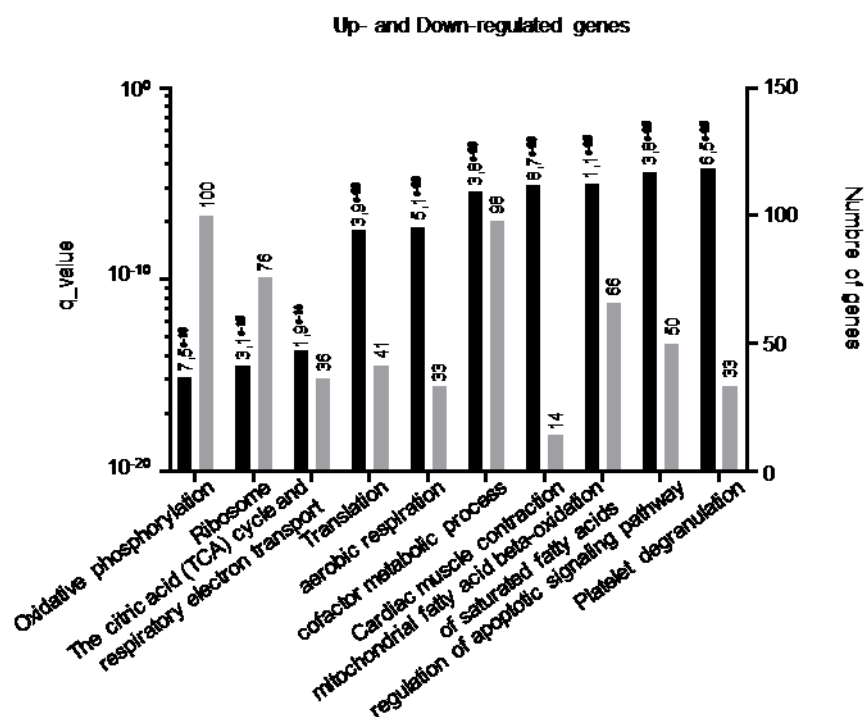
Supplemental Figure 2.5 : Genes near $ER\alpha^{spevWATenh}$ BS are involved in PPAR signaling pathway.



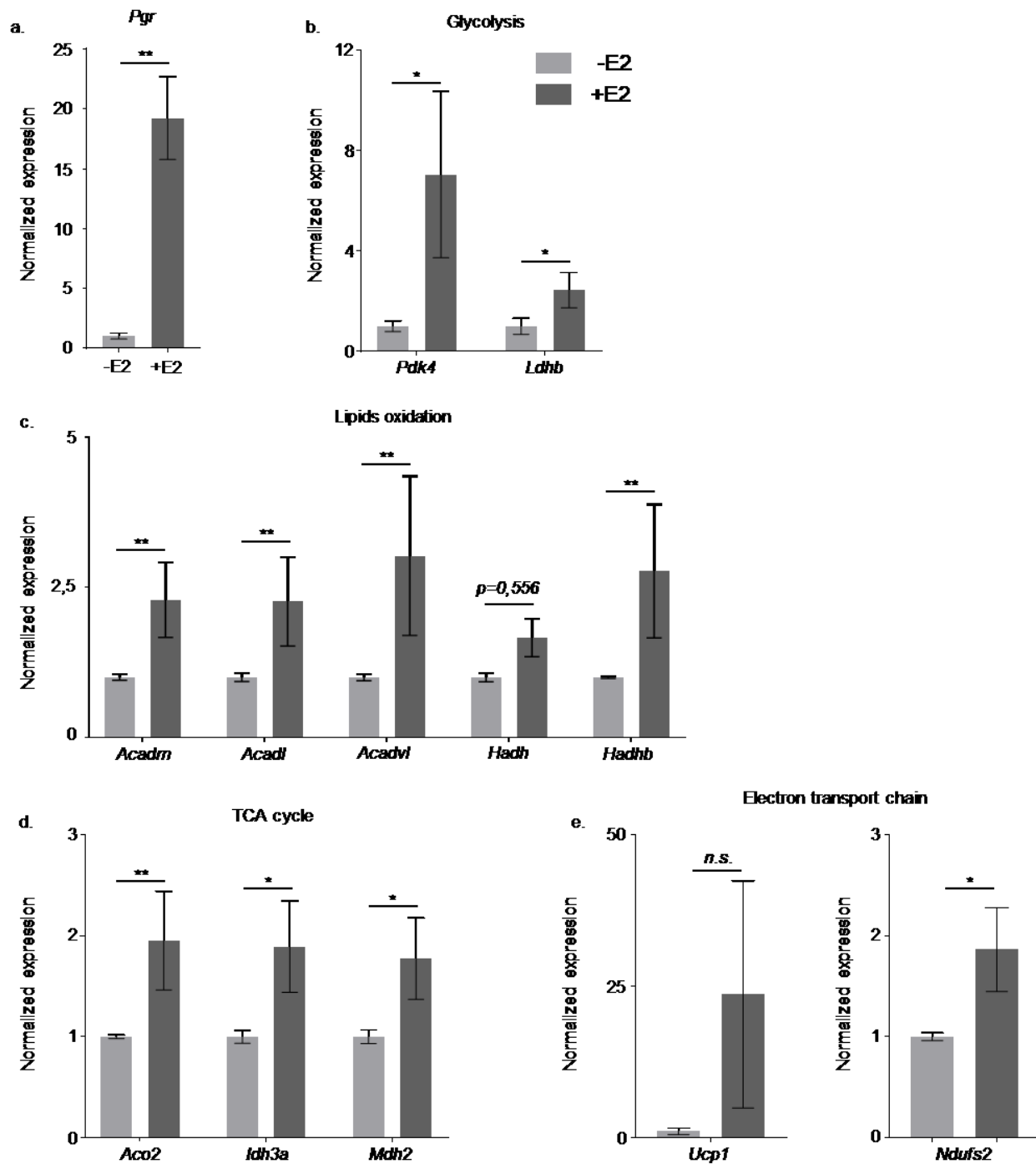
Supplemental Figure 2.6 : Genes near $ER\alpha^{spevWATenh}$ BS are involved in the fatty acid degradation pathway.



Supplemental Figure 2.7 : CEBPB is associated with ER α at ER α ^{spevWA}Tenh-hH3K27ac BS in vWAT.



Supplemental Figure 2.8 : E2 treatment affect the expression of genes involved in lipid metabolism and energy expenditure.



Supplemental Figure 2.9 : Validation by RT-qPCR of E2-target gene found by RNA-seq in vWAT.

2.11. References

1. Heldring, N. *et al.* Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* **87**, 905–931 (2007).
2. Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5925–5930 (2002).
3. Jensen, E. V. On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* **6**, 47–60 (1962).
4. Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. & Frackelton, A. R. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1649–1660 (2000).
5. Prossnitz, E. R. & Barton, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 715–726 (2011).
6. Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 170–182 (2014).
7. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J. & Hevener, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr. Rev.* **34**, 309–38 (2013).
8. Fontana, R. & Della Torre, S. The deep correlation between energy metabolism and reproduction: A view on the effects of nutrition for women fertility. *Nutrients* **8**, (2016).
9. Della Torre, S. *et al.* Short-term fasting reveals amino acid metabolism as a major sex-discriminating factor in the liver. *Cell Metab.* **28**, 256–267 (2018).
10. Lizcano, F. & Guzmán, G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed Res. Int.* **2014**, 757461 (2014).
11. Newell-Fugate, A. E. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte

function. *Reproduction* **153**, R133–R149 (2017).

12. Jones, M. E. *et al.* Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12735–12740 (2000).

13. Carr, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2404–2411 (2003).

14. Leitman, D. C. *et al.* Tissue-specific regulation of genes by estrogen receptors. *Semin. Reprod. Med.* **30**, 14–22 (2012).

15. Drew, B. G. *et al.* Estrogen receptor (ER) α -regulated lipocalin 2 expression in adipose tissue links obesity with breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* **290**, 5566–5581 (2015).

16. D'Eon, T. M. *et al.* Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J. Biol. Chem.* **280**, 35983–35991 (2005).

17. Santosa, S. & Jensen, M. D. Adipocyte fatty acid storage factors enhance subcutaneous fat storage in postmenopausal women. *Diabetes* **62**, 775–782 (2013).

18. Ribas, V. *et al.* Skeletal muscle action of estrogen receptor α is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. *Sci Transl Med* **8**, (2016).

19. Della Torre, S. *et al.* Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor α integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab.* **13**, 205–14 (2011).

20. Matic, M. *et al.* Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor α action. *PLoS One* **8**, e57458 (2013).

21. Yadav, R. N. S. & Singh, S. N. Regulation of rat liver NADP⁺-isocitrate dehydrogenase during aging. *J. Biosci.* **2**, 15–22 (1980).

22. Gordon, F. K. *et al.* Research resource: Aorta- and liver-specific ER α -binding patterns and gene regulation by estrogen. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1337–51 (2014).

23. Galic, S., Sachithanandan, N., Kay, T. W. & Steinberg, G. R. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochem. J* **461**, 177–188 (2014).
24. Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. & White, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* **277**, 42394–42398 (2002).
25. Palanivel, R. *et al.* Reduced Socs3 expression in adipose tissue protects female mice against obesity-Induced insulin resistance. *Diabetologia* **55**, 3083–3093 (2012).
26. Monteiro, R., Teixeira, D. & Calhau, C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–20 (2014).
27. Martínez de Morentin, P. B. *et al.* Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab.* **1**, 1–13 (2014).
28. Bernasochi, G. B., Bell, J. R., Simpson, E. R., Delbridge, L. M. D. & Boon, W. C. Impact of estrogens on the regulation of white, beige, and brown adipose tissue depots. *Compr. Physiol.* **9**, 457–475 (2019).
29. Heintzman, N. D. *et al.* Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**, 108–112 (2009).
30. Martinkovich, S., Shah, D., Planey, S. L. & Arnott, J. A. Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility. *Clin. Interv. Aging* **9**, 1437–1452 (2014).
31. Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell* **27**, 691–700 (2007).
32. Lefterova, M. M. I. *et al.* PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* **22**, 2941–2952 (2008).
33. Gao, H., Fält, S., Sandelin, A., Gustafsson, J.-Å. & Dahlman-Wright, K. Genome-wide identification of estrogen receptor α -binding sites in mouse liver. *Mol. Endocrinol.* **22**, 10–22 (2008).

34. Palierne, G. *et al.* Changes in gene expression and estrogen receptor cistrome in mouse liver upon acute E2 treatment. *Mol. Endocrinol.* **30**, 709–732 (2016).
35. Hirata, S., Shoda, T., Kato, J. & Hoshi, K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 124–129 (2003).
36. Herynk, M. H. & Fuqua, S. A. W. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* **25**, 869–898 (2004).
37. Boonyaratanakornkit, V. *et al.* Extranuclear signaling by sex steroid receptors and clinical implications in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **466**, 51–72 (2018).
38. Hattori, Y., Ishii, H., Morita, A., Sakuma, Y. & Ozawa, H. Characterization of the fundamental properties of the N-terminal truncation (δ exon 1) variant of estrogen receptor α in the rat. *Gene* **571**, 117–125 (2015).
39. Zhang, X. T. *et al.* A positive feedback loop of ER- α 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* **30**, 770–780 (2011).
40. Yan, Y., Yu, L., Castro, L. & Dixon, D. ER α 36, a variant of estrogen receptor α , is predominantly localized in mitochondria of human uterine smooth muscle and leiomyoma cells. *PLoS One* **12**, 1–15 (2017).
41. Li, L., Haynes, M. P. & Bender, J. R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4807–4812 (2003).
42. Barros, R. P. a & Gustafsson, J.-Å. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* **14**, 289–99 (2011).
43. Gorres, B. K., Bomhoff, G. L., Morris, J. K. & Geiger, P. C. In vivo stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *J. Physiol.* **589**, 2041–2054 (2011).
44. Gupte, A. A., Pownall, H. J. & Hamilton, D. J. Estrogen: An emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J. Diabetes Res.* **2015**, (2015).
45. Knudsen, J. G., Biensø, R. S., Hassing, H. a., Jakobsen, A. H. & Pilegaard, H.

Exercise-induced regulation of key factors in substrate choice and gluconeogenesis in mouse liver. *Mol. Cell. Biochem.* **403**, 209–217 (2015).

46. Pilegaard, H. & Darrell Neuffer, P. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 221–226 (2004).

47. Santos, R. S. *et al.* Activation of estrogen receptor alpha induces beiging of adipocytes. *Mol. Metab.* **18**, 51–59 (2018).

48. Baby, V. *et al.* Cloning and transplantation of the mesoplasma florum genome. *ACS Synth. Biol.* **7**, 209–217 (2018).

49. Svotelis, A., Gévry, N. & Gaudreau, L. Chromatin immunoprecipitation in mammalian cells. in *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein, DNA-Protein Interactions* (eds. Moss, T. & Leblanc, B.) **543**, 243–251 (Springer protocols, 2009).

50. Bianco, S., Jangal, M., Garneau, D. & Gévry, N. LRH-1 controls proliferation in breast tumor cells by regulating CDKN1A gene expression. *Oncogene* **34**, 1–10 (2014).

51. Ye, T. *et al.* seqMINER: An integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1–10 (2011).

52. Coulombe, C. *et al.* VAP: A versatile aggregate profiler for efficient genome-wide data representation and discovery. *Nucleic Acids Res.* **42**, 485–493 (2014).

53. Shin, H., Liu, T., Manrai, A. K. & Liu, S. X. CEAS: Cis-regulatory element annotation system. *Bioinformatics* **25**, 2605–2606 (2009).

54. Heinz, S. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576–89 (2010).

55. Ijlst, L. & Wanders, R. J. A simple spectrophotometric assay for long-chain acyl-CoA dehydrogenase activity measurements in human skin fibroblasts. *Ann. Clin. Biochem.* **30**, 293–297 (1993).

56. Yao, K.-W. & Schulz, H. Specific assay of medium-chain acyl-CoA

dehydrogenase based on the spectrophotometric measurement of product formation.
Anal. Biochem. **214**, 528–534 (1993).

Chapitre 3 : Impacts de l'obésité sur la réponse aux œstrogènes dans le tissu adipeux blanc murin

3.1. Introduction

L'obésité est une pathologie affectant de manière profonde la régulation de l'expression des gènes des tissus concernés : tissu adipeux blanc (WAT), le foie, le muscle squelettique ou encore la glande pituitaire¹. Le contrôle de l'expression génique est dépendant des facteurs de transcription mais aussi de nombreux facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, ainsi que de la présence ou non de variants d'histone. Plus précisément, ce chapitre se concentre sur la méthylation de l'ADN, qui se résume en une méthylation d'un doublet CpG sur le résidu cytosine². Généralement, la méthylation de l'ADN est associée à la répression de la transcription mais plus récemment, cette marque apparaît comme ambiguë puisqu'elle peut servir aussi au recrutement de facteurs de transcription³. Elle est inscrite par des enzymes éditrices ayant une activité DNA méthyltransférases, les DNMTs qui existent au nombre de trois : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b². De manière intéressante, l'obésité est associée avec un changement dans le patron de méthylation du génome des adipocytes blancs proche de gènes impliqués dans la voie de l'insuline, participant ainsi à la résistance à l'insuline^{4,5}. Or, la méthylation du génome ainsi que les marques épigénétiques permettent le maintien de l'identité cellulaire de chaque tissu et donc la spécificité de la réponse à des stimuli externes des adipocytes^{6,7}.

Le tissu adipeux blanc est séparé en de multiples dépôts qui sont regroupés en deux grandes classes : le tissu adipeux blanc viscéral (vWAT), à l'intérieur du péritoine et le tissu adipeux blanc sous-cutané (scWAT), sous la peau. L'étude des patrons de méthylation de l'ADN dans ces différents types de dépôts ont montré des profils différents affectant en particulier la composition en acide gras des gouttelettes lipidiques composant

les adipocytes. Plus récemment, le profil de méthylation de l'ADN des adipocytes a pu être relié avec l'indice de masse corporelle et de la disposition androïde ou gynoïde des dépôts de WAT⁸. En particulier, la méthylation de gènes tels que *AOC3*, *LIPE*, *SOD3*, *AQP7* et *CETP* qui sont tous reliés à des impacts métaboliques majeurs sur le métabolisme des graisses, la résistance à l'insuline ou encore l'adipogenèse⁸. Chez les souris obèses, DNMT1 joue un rôle important dans la mise en place d'un profil de méthylation particulier. DNMT1 méthyle le promoteur du gène de l'adiponectine, induisant une résistance à l'insuline dans les souris db/db, KO pour le gène du récepteur à la leptine⁹. Une inhibition de l'activité DNMT par l'agent de chimiothérapie RG108 ou par le 5-azacytidine améliore la réponse à l'insuline^{4,9}. La résistance à l'insuline induite par l'obésité a aussi été associée avec l'activité d'une autre DNA méthyltransférase DNMT3a, puisqu'un KO du gène *Dnmt3a* ou une inhibition de l'enzyme protège contre la résistance à l'insuline induit par un régime riche en graisses⁴.

Parallèlement, le métabolisme des graisses est contrôlé par les œstrogènes et plus particulièrement par son récepteur ER α ^{10,11}. En effet, la perte des œstrogènes survenant à la ménopause chez la femme ou lors d'une ovariectomie chez les rongeurs affecte de manière importante le métabolisme énergétique au niveau central et périphérique. Au niveau central, ce sont des nœuds de l'hypothalamus exprimant ER α qui sont affectés par la perte des œstrogènes en augmentant ainsi la prise alimentaire mais aussi en contrôlant la dépense énergétique des tissus périphériques¹². Les tissus périphériques tels que le muscle squelettique et le foie expriment aussi ER α et sont aussi affectés par la perte des œstrogènes. Il y a une perte de la lipolyse au profit de la lipogenèse dans le foie corrélée avec une augmentation de la résistance à l'insuline ainsi qu'une stéatose hépatique¹¹. La résistance à l'insuline augmente aussi dans le muscle squelettique mais cette conséquence de la perte des œstrogènes n'a pas été corrélée avec des effets génomiques de ER α , contrairement aux autres tissus impliqués dans le métabolisme énergétique^{11,13}.

Le WAT est aussi affecté par la perte des œstrogènes, par des effets directs de ER α sur l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation des lipides, la glycolyse ainsi que dans la dépense énergétique dans le vWAT précisément (données en cours de

publication). En effet, notre laboratoire a combiné des techniques de ChIP-seq et de RNA-seq afin de cartographier la liaison de ER α à la chromatine spécifique au vWAT et d'identifier les changements dans le transcriptome induits par une stimulation à l'E2. La présence de cibles telles que *Pdk4*, *Acadm*, *Hadhb*, *Idh3a*, *Aco2* ou encore *Ucp1* ont permis de déterminer que la lipolyse était favorisée par rapport à la glycolyse, ainsi que des signes de brunissement du tissu étaient observés.

Les effets de l'obésité sur les marques épigénétiques dans les tissus impliqués dans le métabolisme énergétique sont beaucoup étudiés, et la réponse à l'insuline dans ce contexte est une voie de recherche majeure pour la santé publique. Nous posons ici la question de l'impact de l'obésité sur la réponse aux œstrogènes du vWAT. Nous avons ainsi observé une réponse diminuée voire abolie des gènes cibles de ER α après une stimulation à l'œstradiol en cas d'obésité induite par le régime. Cette réponse amoindrie est corrélée avec une méthylation des sites de liaison avec ER α , une perte des marques de la chromatine synonymes d'activation de la transcription ainsi qu'à une fermeture de la chromatine. De manière intéressante, l'expression des *Dnmt1* et *Dnmt3a* est augmentée chez les souris obèses et une stimulation à l'œstradiol diminue l'expression des deux gènes en cas d'obésité seulement. Ces résultats nous amènent donc à supposer que l'obésité est associée avec une résistance à la réponse aux œstrogènes dans le vWAT, entraînant alors une perte de la protection contre les pathologies métaboliques.

3.2. Résultats

3.2.1. Perte de la stimulation des cibles de ER α par l'E2 dans le vWAT des souris obèses

Afin de vérifier l'impact de l'obésité sur la réponse à l'E2 des cibles de ER α , des souris CD-1 ont été nourries pendant trois mois avec un régime standard (groupe contrôle ou NF) et un régime occidentalisé (groupe riche en gras ou HF). Le groupe HF développe une obésité induite par le régime : les souris HF pèsent en moyenne 40,32 g et ont une masse 1.16 fois supérieure aux souris NF (34,78 g) après trois mois de régime (Figure

3.1A et 3.1B). La prise de poids est particulièrement remarquable sur les dépôts de tissus adipeux blancs périgonadal (viscéral) et inguinal (sous-cutané) ayant une masse respectivement de 2,35 (0,97 g à 2,28 g) et 1,68 (0,53 g à 0,89 g) fois supérieure chez les souris HF par rapport aux NF (Figure 3.1B). Cette prise de poids est connue dans la littérature pour affecter la sensibilité à l'insuline mais module-t-elle la sensibilité à l'œstradiol ?

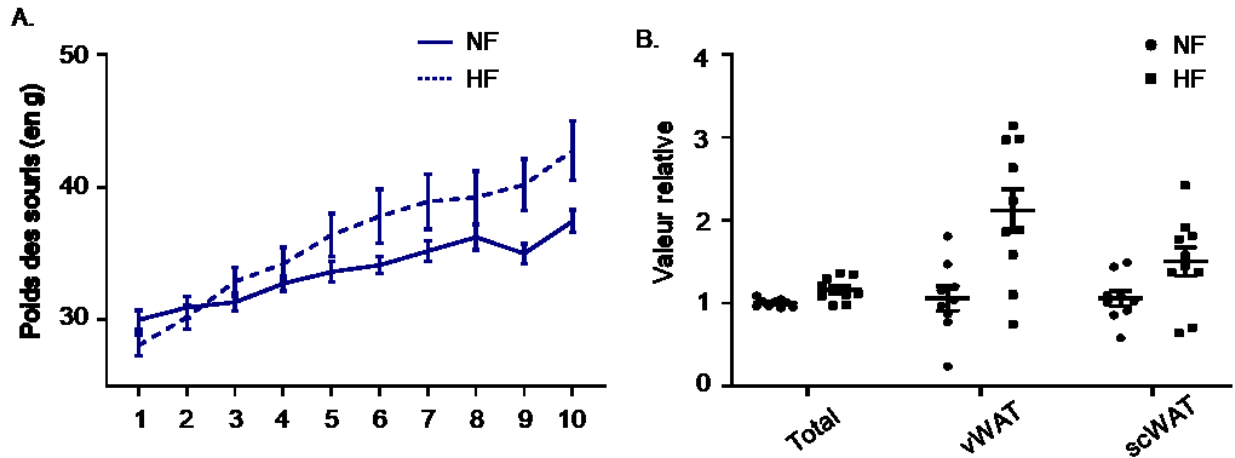


Figure 3.1 : Les souris nourries avec un régime occidentalisé accumulent plus de graisse par rapport à des souris nourries avec un régime standard

A. Suivi du poids des souris durant les 10 premières semaines de régime riche en gras (n=10) et standard (n=10) avant leurs ovariectomies. Le poids des souris est exprimé en gramme (\pm SEM). B. Poids relatif total ainsi que des dépôts de WATv périgonadal et de WATsc inguinal des souris nourries avec un régime riche en gras (n=10) et avec un régime standard (n=9). Chaque point représente le poids relatif total ou d'un des deux dépôts de WAT respectivement sur la moyenne des poids totaux ou des dépôts des souris nourries avec le régime standard.

Pour y répondre, les souris ont été traitées à la fin des trois mois de régime par de l'œstradiol ou par un traitement placebo. Afin d'identifier l'effet direct du traitement sur les cibles de ER α , la durée entre les injections et la récolte des tissus a été fixé à 4 heures, comme dans notre précédente publication (voir chapitre 1). Dans le vWAT des souris NF, l'expression des gènes cibles de ER α tels que *Pgr*, *Pdk4*, *Acadm*, *Aco2*, *Pparg* ou encore *Ucp1* est augmentée par le traitement à l'E2 (Figure 3.2). Cependant, chez les souris HF, l'expression des gènes cibles de ER α n'est pas augmentée par le traitement à l'E2. Seul

le gène *Pgr* a son expression augmentée après la stimulation à l'E2 dans les souris HF et dans une proportion nettement inférieure à ce qui est observé chez les souris NF : l'induction du gène passant de 15,91 fois chez les souris NF à 6,19 fois dans les souris HF. Une des marques épigénétiques pouvant affecter la réponse à l'E2 et à ER α est la méthylation de l'ADN. Nous avons tenté d'y répondre à partir de base de données sur la méthylation de l'ADN chez des souris CD-1 obèses publiées précédemment.

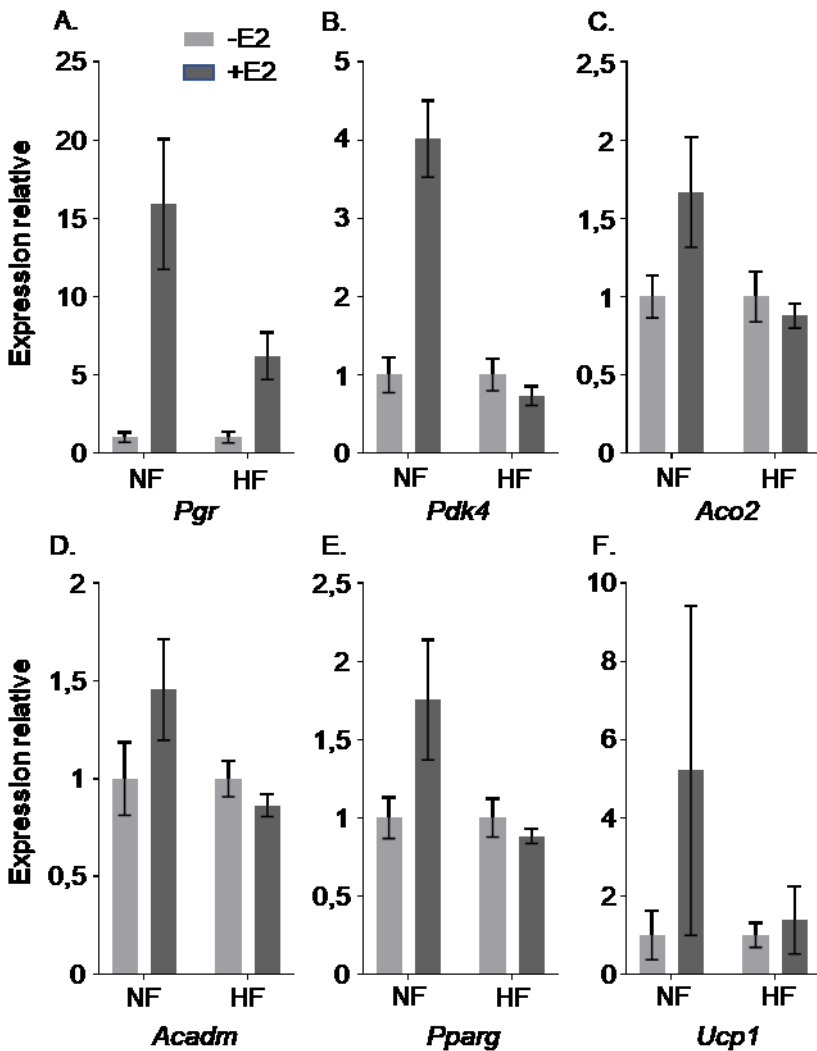


Figure 3.2 : Les gènes cibles de la voie E2/ER α répondent moins efficacement à l'E2 dans le WATv des souris nourries avec un régime riche en gras

A. Le gène modèle cible de E2/ER α , *Pgr*, répond moins efficacement à l'E2 dans les souris nourries avec un régime riche en gras par rapport aux souris nourries avec un régime standard. Ce phénomène est aussi observé avec *Pdk4* (B.), impliqué dans la glycolyse, *Aco2* (C.), impliqué dans le cycle de Krebs, *Acadm* (D.), impliqué dans la β -

oxydation des lipides, *Pparg* (E.), essentiel à de nombreux processus biologiques des adipocytes et *Ucp1* (F.), impliqué dans la thermogénèse. Les résultats sont exprimés en moyennes relatives aux échantillons -E2 (\pm SEM, n=4 par groupe).

3.2.2. Les sites de liaison de ER α sont retrouvés globalement hyperméthylés dans le vWAT des souris obèses.

Les données de méthylation de l'ADN ont été obtenues chez les mêmes souris que nous avons utilisées et selon le même traitement : 3 mois de nourriture occidentalisée riche en gras. L'ADN méthylé a été hybridé sur une micropuce CHARM. Etant donné que tout le génome n'est pas représenté sur la micropuce, nous avons dans un premier temps déterminé que 8234 sur 20723 sites de liaison de ER α identifiés précédemment y sont représentés (Figure 3.3A). Sur ces 8234 sites de liaison, 2657 régions sont hyperméthylées à un site minimum dans les souris atteintes d'obésité nutritionnelle par rapport au groupe contrôle, contre 779 qui sont hypométhylées. 4847 sites de liaison de ER α ne semblent pas avoir de variation de méthylation entre les groupes de souris. Les classes de gènes enrichies près des sites de liaison à ER α qui sont retrouvés hyperméthylés sont associées au métabolisme des lipides et dans la différenciation des adipocytes (Figure 3.3B). *Pparg* et *Pdk4* sont entre autres retrouvés dans ces catégories, mais aussi de nombreux facteurs de transcription essentiels au brunissement du WAT tels que *Ppara*, *Cebpb* ou *Prdm16* (Figure 3.3C).

Étant donné que la plupart des cibles de ER α dans le vWAT sont impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire et sont alors les cibles d'autres facteurs de transcription, nous nous concentrerons dans ce chapitre sur *Pgr* puisqu'il s'agit d'une cible majeure de ER α et que le gène devrait être moins affecté par ces autres facteurs. Deux sites de liaison de ER α sont retrouvés autour du gène *Pgr* (Figure 3.4A à C). Le premier dans l'intron situé entre les exons 3 et 4 du gène et le second après la partie terminale du gène. Le promoteur du gène ainsi que le site de liaison 2 sont représentés sur la micropuce et seul le site de liaison 2 est retrouvé méthylé dans le vWAT des souris obèses. Le premier site de liaison n'est pas représenté sur la micropuce. Nous avons alors effectué un ChIP-qPCR sur l'ADN du vWAT des souris à l'aide d'un anticorps dirigé

vers la 5-méthyl-cytosine afin de vérifier les niveaux de méthylation de ces deux sites de liaison (Figure 3.4D). Le site de liaison 1 montre autant de méthylation que le contrôle négatif, alors que le site de liaison 2 montre une méthylation plus importante chez les souris NF, qui est accrue chez les souris HF.

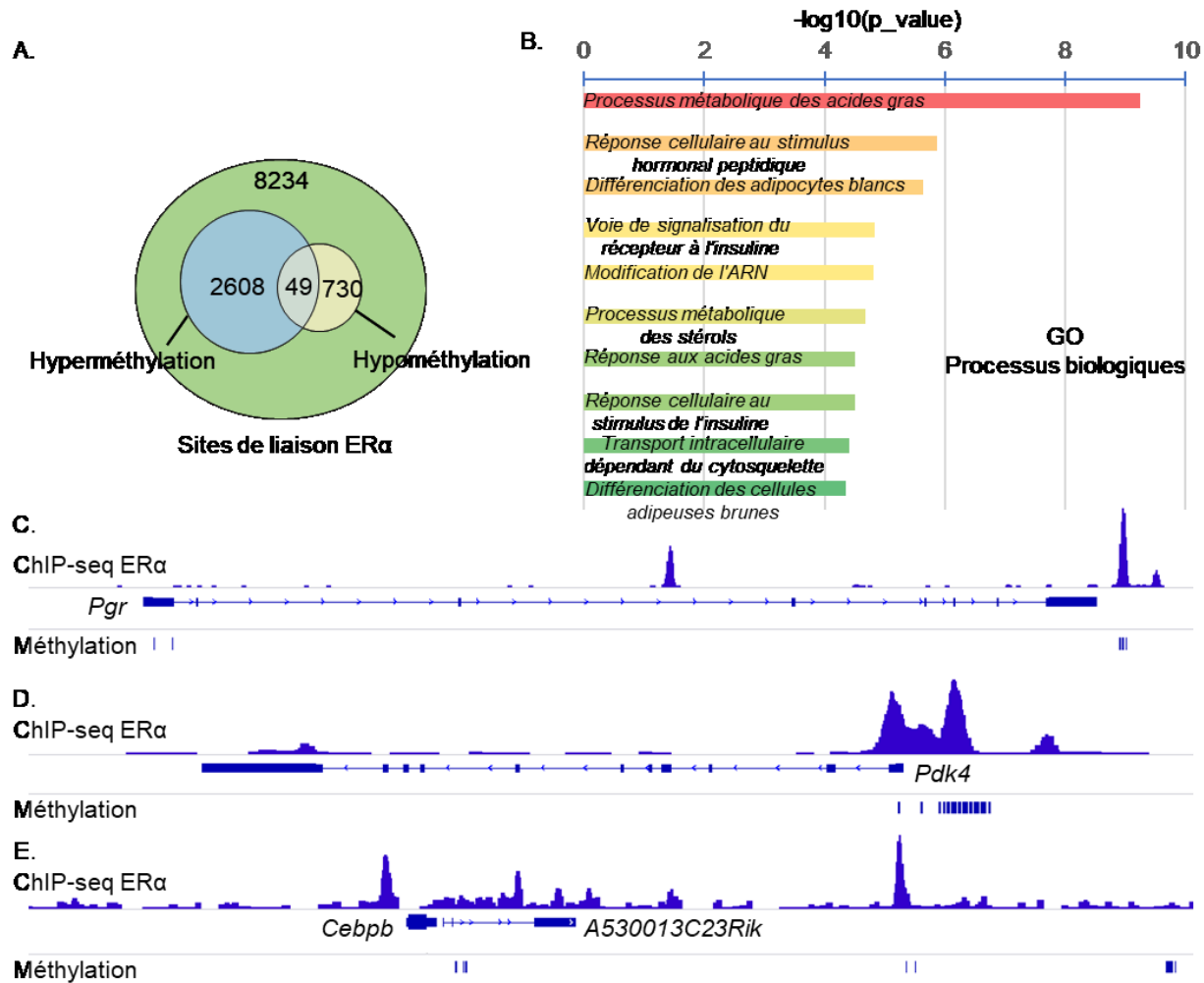


Figure 3.3 : Les sites de liaison de ERα dans le vWAT liés aux processus de dégradation des lipides et à la voie de l'insuline sont hyperméthylés chez les souris nourries avec un régime riche en gras

A. L'analyse de la puce CHARM a révélé que 3387 sites de liaison de ERα dans le vWAT subissent un changement de méthylation chez les souris nourries avec un régime riche en gras. B. Les classes des ontologies des gènes enrichies proches des sites de liaison de ERα subissant un changement de méthylation sont représentées ici en fonction de leur p_value . Profils combinés des ChIP-seq de ERα et des sondes retrouvées plus méthylées autour des gènes *Pgr* (C.), *Pdk4* (D.) et *Cebpb* (E.) dans les échantillons HF par rapport aux échantillons NF.

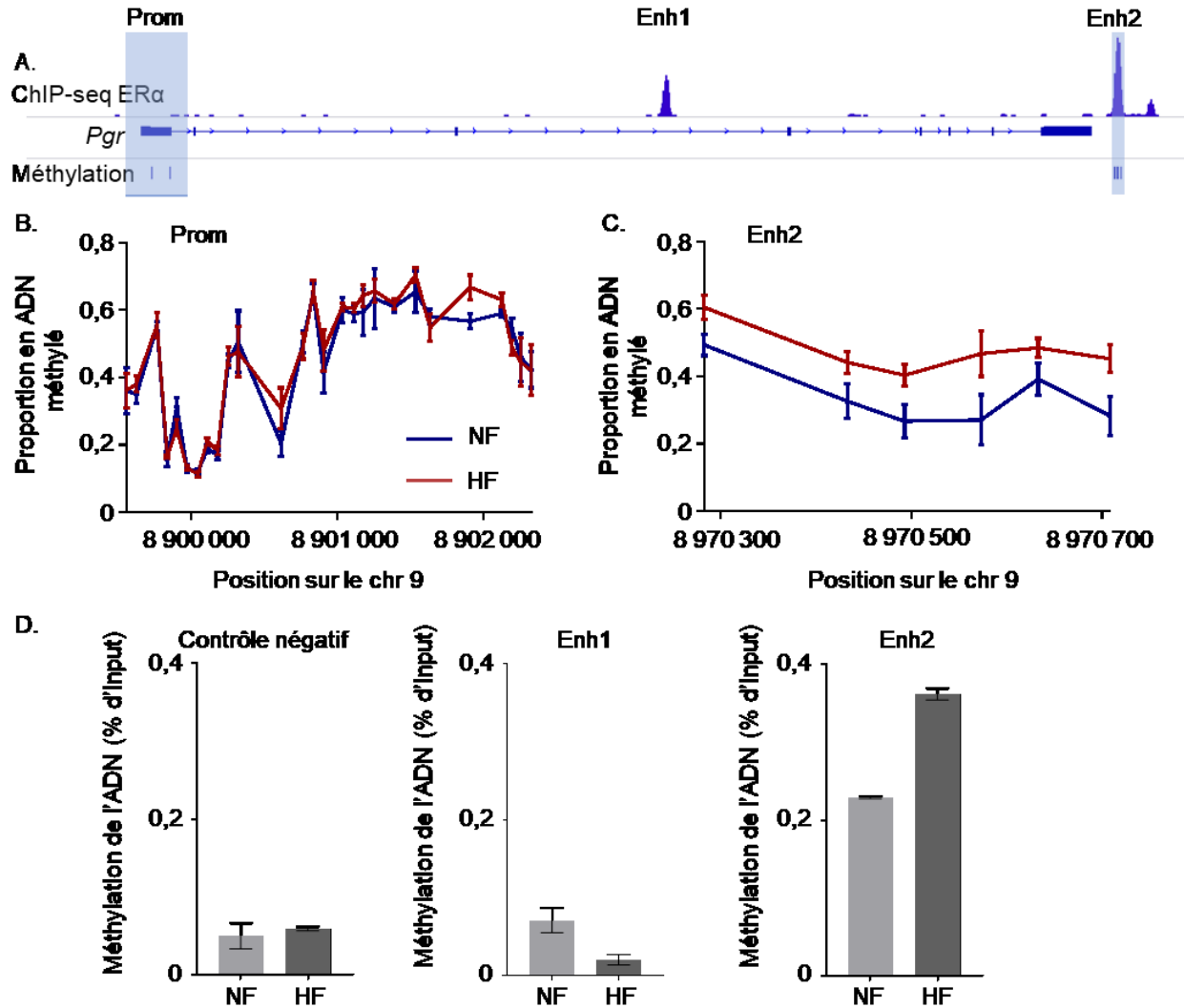


Figure 3.4 : Un enhancer putatif de *Pgr* et le site de liaison de *ERα* sont hyperméthylés chez les souris nourries avec un régime riche en gras

A. Cartographie des sites de liaison de *ERα* et des régions retrouvées plus méthylées chez les souris nourries avec un régime riche en gras par rapport aux souris nourries avec un régime standard. Les trois régions qui sont utilisées dans la suite des expérimentations sont le promoteur de *Pgr* et les sites de liaison 1 et 2 de *ERα* (notés enh1 et enh2) dont seul le promoteur et le site enh2 sont retrouvés sur la puce CHARM. B. et C. Valeurs de méthylation retrouvées sur la puce CHARM pour les sondes situées au niveau du promoteur de *Pgr* (B.) et de l'enh2 (C.). Les valeurs représentées ici sont des proportions d'ADN méthylé (1 correspondant à 100%, $n=6$ par groupe). D. Valeur de méthylation retrouvée à partir du kit MagMeDIP (Diagenode) au niveau des site de liaison Enh1 et Enh2. Les valeurs représentées ici sont en % d'input (\pm SEM, $n=2$ par groupe).

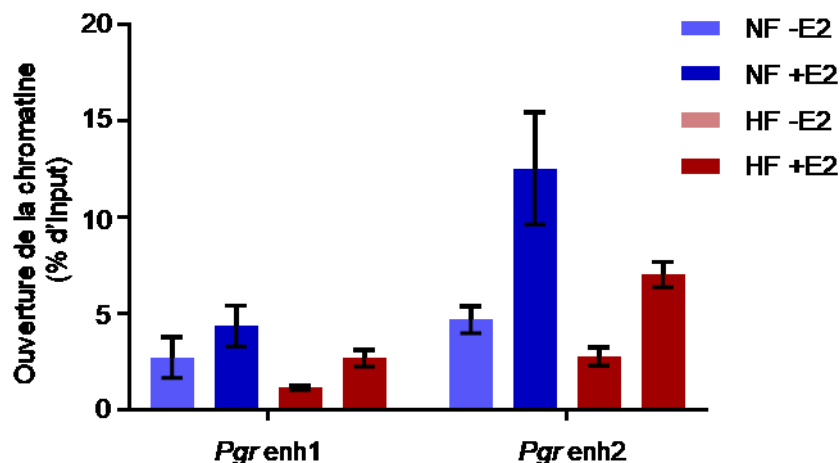


Figure 3.5 : La chromatine est moins accessible aux régions méthylées dans les souris HF comparées aux souris NF

L'accessibilité de la chromatine a été déterminée par la technique de FAIRE. L'accessibilité est exprimée en moyenne du % d'input pour chacune des conditions (\pm SEM, $n=2$), plus le % d'input est élevé plus la chromatine est accessible.

La méthylation peut être associée avec une fermeture de la chromatine et ainsi une diminution de l'accès à l'ADN à ces régions menant à une perte du recrutement des facteurs de transcription. Par la technique de FAIRE, il a été possible de vérifier l'accessibilité de la chromatine au niveau des sites de liaison de ER α autour de *Pgr* (Figure 3.5). Aucune différence significative n'est retrouvée entre les échantillons provenant des souris NF et HF au niveau du site de liaison 1. A l'opposé, au niveau du site de liaison 2, l'ADN est significativement plus disponible chez les souris NF en comparaison aux souris HF après le traitement à l'E2. La perte de l'accessibilité de l'ADN pourrait entraîner la perte du recrutement des facteurs de transcription tels que ER α .

3.2.3. L'obésité est associée à une perte de la fixation de ER α à la chromatine

Nous supposons maintenant que la perte de la réponse à l'E2 dans le vWAT des souris HF serait dû à une perte de la liaison de ER α à la chromatine. Nous avons donc effectué des ChIP-qPCR à l'aide d'un anticorps dirigé contre ER α (Figure 3.6). De manière

intéressante, ER α se fixe à la chromatine à des niveaux comparables après le traitement à l'E2 entre les souris NF et HF au niveau du site de liaison 1. Cependant, la fixation de ER α au niveau du site de liaison 2 est diminuée dans les souris HF en comparaison aux souris NF après le traitement à l'E2. On observe des résultats similaires au niveau des sites de liaison de ER α proche du promoteur de *Pdk4*. La fixation de ER α à la chromatine est souvent associée avec des marques d'activation des enhancers telles que l'histone H3 acétylé sur sa lysine 27 (H3K27ac).

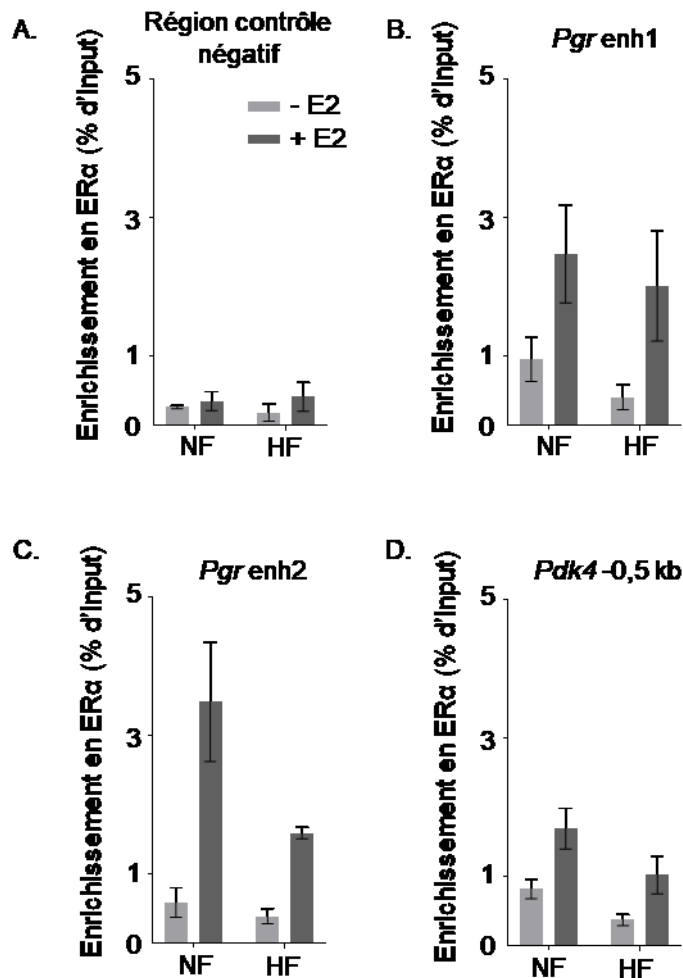


Figure 3.6 : ER α est moins recruté aux enhancers plus méthylés en condition HF

Les graphiques de cette figure représentent la présence de ER α à la chromatine dans les différentes conditions (HF, NF, -E2 et +E2). Les régions testées sont une région contrôle ne recrutant pas ER α (A.), les régions enh1 (B.) et enh2 (C.) autour de *Pgr*, et une région recrutant ER α à 500 pb en amont du promoteur de *Pdk4* (D.). Les résultats sont représentés en % d'input (\pm SEM, n=3 pour chaque groupe).

Nous avons ainsi ensuite effectué un ChIP-qPCR en utilisant un anticorps dirigé contre la marque d'histone synonyme d'activation qu'est H3K27ac (Figure 3.7). Les histones sont positionnées généralement de part et d'autre des sites de fixation des facteurs de transcription, permettant leur liaison à la chromatine. Nous avons alors ciblé une région située à -350 paires de base du site de fixation à ER α . Nous avons identifié que le traitement à l'œstradiol induit une augmentation de la présence de la marque H3K27ac seulement dans le vWAT des souris NF. Ce résultat peut être relié avec le reste des résultats obtenus dans ce chapitre : une baisse de réponse à l'E2 des cibles de ER α , une méthylation des sites de ER α , une perte d'accessibilité de l'ADN ainsi qu'une baisse de la fixation de ER α .

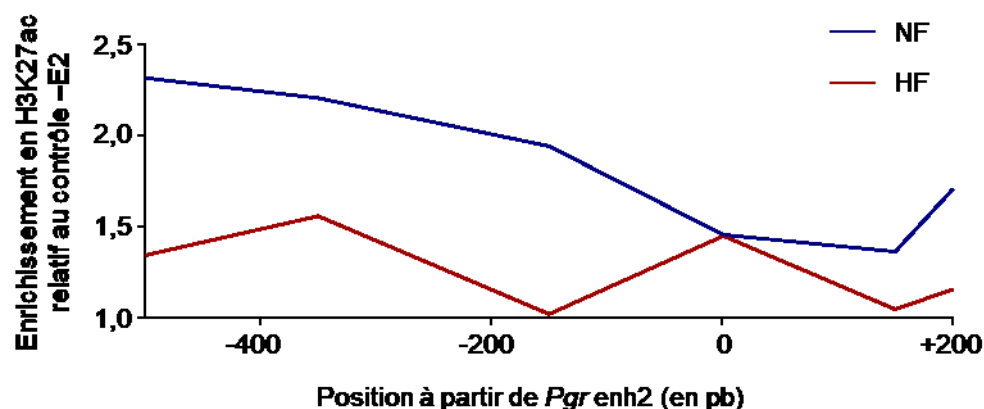


Figure 3.7 : La fixation de ER α à la chromatine entraîne moins de déposition de la marque de la chromatine H3K27ac synonyme d'activation

Des ChIP-qPCR contre les marques d'histone H3 et H3K27ac ont été faits autour de la région enh2 de Pgr. Les valeurs de ChIP-H3K27ac ont dans un premier temps été normalisées sur la quantité de H3 présente à ces régions. Ces valeurs ont ensuite été rapportées sur les valeurs de l'échantillon -E2 dans chacune des conditions (NF et HF), montrant ainsi l'enrichissement de la présence de H3K27ac dans l'échantillon +E2 par rapport à l'échantillon -E2.

Nous supposons que la méthylation de l'ADN est l'élément déclencheur de la perte de la réponse aux œstrogènes. *Dnmt1* et *Dnmt3a* sont deux DNA-méthyltransférases identifiées précédemment dans les modèles de souris comme affectant la méthylation du vWAT pendant le développement de l'obésité. Contrairement à ce qui a été observé

précédemment, l'expression de ces deux gènes n'est pas affectée par le régime occidentalisé suivi par les souris (Figure 3.8). En revanche, le traitement à l'E2 diminue l'expression de ces deux gènes dans les souris ayant subies un régime riche en gras particulièrement, suggérant un lien entre ER α et les processus de méthylation de l'ADN dans le vWAT.

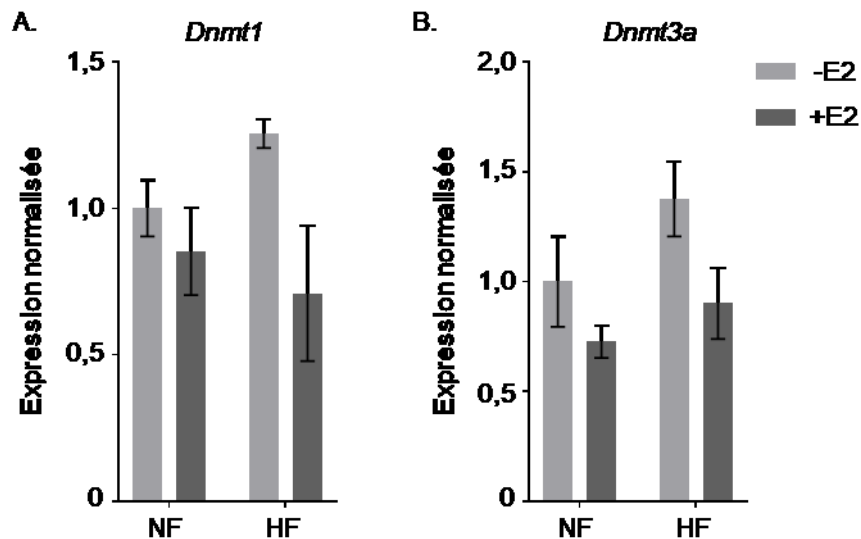


Figure 3.8 : Les expressions de *Dnmt1* et *Dnmt3a* sont diminuées par le traitement à l'E2

Les expressions de *Dnmt1* (A.) et de *Dnmt3a* (B.), deux méthyltransférases d'ADN, sont exprimées en fonction des moyennes des échantillons -E2 (\pm SEM, $n=4$ par condition).

3.3. Discussion

L'obésité provoque un profond changement dans la patron de méthylation de l'ADN dans le tissu adipeux à l'origine entre autres d'une résistance à l'insuline^{4,5,8,9}. Nous avons observé ici en utilisant le gène modèle *Pgr*, que l'impact de l'obésité sur le tissu adipeux blanc va plus loin et affecte aussi la voie des œstrogènes et de ER α . En effet, l'expression des gènes cibles de la voie E2/ER α identifiés précédemment dans notre laboratoire n'est pas induite par une stimulation à l'E2 dans le vWAT des souris obèses. Cette perte de

sensibilité aux œstrogènes est accompagnée par une perte du recrutement de ER α à ses enhancers chez les souris obèses ainsi qu'une perte des marques de la chromatine synonymes d'activation de la transcription.

La méthylation de l'ADN jouant un rôle essentiel dans la mise en place de la résistance à l'insuline dans le vWAT des souris obèses, nous avons par la suite tenté de lier la méthylation de l'ADN avec la baisse de sensibilité à l'œstradiol observée chez les souris obèses. De manière intéressante, les données de micropuces disponibles en ligne⁵ nous indiquent la présence d'une méthylation accrue autour des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et au niveau des sites de liaison de ER α . Les données sur *Pgr* sont particulièrement flagrantes, où l'obésité est associée à une hausse de la méthylation d'un site de liaison de ER α . Par comparaison avec un second site de liaison à ER α non méthylé où ce phénomène n'est pas observé, nous supposons que c'est cette méthylation qui affecte la liaison de ER α à la chromatine et indirectement l'expression des cibles de ER α dans les souris obèses.

Comme mentionné plus tôt, la voie de ER α et des œstrogènes protège contre les pathologies métaboliques comme l'obésité^{10,11}. Nos résultats laissent entendre que l'obésité contrecarre ces effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique, amenant à une perte de cette protection. Nos résultats ont été effectués trois mois après le début du régime standard ou occidentalisé et ne permettent pas de conclure sur la causalité existante entre la résistance aux œstrogènes et l'obésité : est-ce l'obésité qui provoque la perte de réponse aux œstrogènes ou l'inverse ? ou est-ce une combinaison de ces deux ? Ces problématiques constituent le principal point faible de cette étude, basée sur la description d'un phénomène sans que le mécanisme sous-jacent n'ait été identifié.

La génistéine est un phyto-œstrogène retrouvé dans de nombreuses plantes, en particulier dans le soja¹⁴. C'est une isoflavone capable de se lier autant à ER α qu'à ER β , stimulant ainsi la voie des œstrogènes et agissant comme un perturbateur endocrinien¹⁵. La génistéine a gagné en popularité ces dernières années grâce à la protection qu'elle apporte, au même titre que l'E2, contre les pathologies métabolique comme l'obésité et le diabète de type II^{14,16}. La génistéine a aussi été liée à une déméthylation des CpG associé à des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers de la prostate¹⁷ et du

sein¹⁸. Elle a aussi été associée à une modification de la méthylation de l'ADN dans des tissus sains tels que le foie, la prostate ou les cellules embryonnaires^{19,20}. Ces résultats, combinés à ceux que nous avons obtenus dans notre modèle nous portent à croire à un effet protecteur de l'E2 contre la méthylation de l'ADN dans la répression de gènes clés dans le métabolisme énergétique sans exclure l'inverse.

Dans le futur, notre laboratoire tentera de répondre à plusieurs questions. La première serait d'observer les conséquences de l'obésité à la chromatine à l'échelle du génome. Une comparaison des sites de liaison de ER α entre les souris contrôles et les souris obèses, combinée à une étude du transcriptome par mRNA-seq nous indiquera les effets globaux du traitement à l'E2. Les modifications associées à l'obésité sur les marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, les marques d'activation H3K27ac ou H3K4me1 ainsi que la disponibilité de l'ADN pourront être vérifiées à l'échelle du génome et comparées aux modifications dans la liaison de ER α . Finalement, ces données seront couplées avec l'utilisation d'inhibiteur des ADN méthyltransférases, en particulier DNMT1 et DNMT3a, responsables de la méthylation de l'ADN dans le développement de l'obésité. Enfin, les expressions de *Dnmt1* et *Dnmt3a* étant affectées par le traitement à l'E2 chez les souris obèses, un traitement combinant l'E2 et les inhibiteurs de DNMTs pourrait être envisagé comme traitement contre l'obésité et ses conséquences métaboliques.

3.4. Matériels et méthodes

3.4.1. Préparation des animaux

Des souris CD-1 ovariectomisées de 8 semaines ont été achetées à partir des laboratoires Charles Rivers. Les animaux sont acclimatés dans une pièce à température contrôlée avec un cycle jour/nuit de 12 heures. L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum*. Les souris contrôles NF sont nourries avec une nourriture standard, les souris HF sont nourries avec une nourriture occidentalisée composée de 42% de graisse (TD.88137,

Envigo). Après trois mois de régime et une prise de poids hebdomadaire, les souris NF et HF reçoivent une injection sous-cutanée de E2 (E2758, Sigma Aldrich) dilué dans de l'huile minéral contenant 10% d'éthanol (250ng/0,1mL). Des souris NF et HF reçoivent une injection sous-cutanée contrôle ne contenant que le véhicule. Les animaux ont été sacrifiés 4 heures après l'injection d'E2 et le vWAT a été récolté pour procéder aux expériences de RT-qPCR, de ChIP, de FAIRE et pour vérifier la méthylation de l'ADN.

3.4.2. RT-qPCR

Les ARN ont été extraits à partir du vWAT à l'aide du kit direct-zol RNA Miniprep (R2052, Zymo Research) 4 heures après les injections d'E2 ou de placebo chez les souris NF et HF. Les ARN purifiés (300 ng) ont été retro-transcrits en ADNc en utilisant la transcriptase inverse M-MLV (P7040, Enzymatics Inc). Les niveaux d'expression d'ARN relatifs pour les gènes testés ont été calculés après leur normalisation sur les niveaux d'expression de Tbp et Rplp0 grâce au C1000TM thermal cycler (Bio-rad). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 3.1.

	Forward	Reverse
mPdk4	TGAACACTCCTTCGGTGCAG	TCGAACTTTGACCAGCGTGT
mAcadm	GAAGCCACGAAGTATGCCCT	CCTTCATCGCCATTTCTGCG
mAco2	GCACAAAATGGCGCCTTACA	ACTGGGCTCAAAATGGCTCA
mTbp	CAGGCGTTCCGTGGATC	CGTCTTCAATGTTCTGGGTTATC
mRplp0	CGTCCTCGTTGGAGTGACAT	TAGTTGGACTTCCAGGTCGC
mPgr		
mUcp1	CACGGGGACCTACAATGCTT	TAGGGGTCGTCCCTTTCCAA
mDnmt1	CAAGATGCCAGCGCGAACA	TTCTCCCTCACACACTCCTTTT
mDnmt3a	GGCGTTAGTGACAAGAGGGA	CAGCAGACACTTCTTTGGCG

Tableau 3.1 : Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude

3.4.3. Analyse du méthylome

Le méthylome des souris obèses et des souris saines a été analysé à partir des données de puce à ADN de Multhaup *et al.*⁵. Brièvement, l'ADN des adipocytes provenant de souris obèses ou non-obèse a été extrait et digéré avec une enzyme appelée McrBC qui permet le clivage de l'ADN au niveau des méthyl-cytosines. Les fragments d'ADN sont ensuite hybridés sur une puce à ADN CHARM et les données ont été normalisées, corrigées et analysées par les auteurs⁵. Les niveaux de méthylation au niveau de chacune des sondes de la puce CHARM ont été récupérés à partir de la base de données GEO de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE63981). Seules les données de localisation de ER α issues du chapitre 2 de ce manuscrit présentes sur la puce CHARM ont été utilisées pour les analyses de ce chapitre grâce à l'outil bedtools intersect (<https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>). Les sondes ayant une différence de 10 % dans leur niveau de méthylation entre les échantillons obèses et non-obèses (n=6) ont été considérées comme variant dans leur niveau de méthylation. Les gènes situés proches de ces sondes variantes entre les conditions ont ensuite été identifiés et une analyse d'ontologie de gène a été effectuée sur ces groupes de gène grâce à l'outil GREAT (<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>).

L'analyse de la méthylation de l'ADN à des régions précises dans le vWAT des souris NF et HF a été effectuée à l'aide du kit MagMeDIP (C02010021, Diagenode) en suivant les recommandations du fabricant.

3.4.4. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les expériences de ChIP ont été effectuées essentiellement comme décrites précédemment²¹, bien que des billes magnétiques aient été utilisées pour l'immunoprécipitation (dynabeads, 10002D, Invitrogen). Les vWAT ont été émincés et fixés dans une solution de PBS contenant 1.1% de formaldéhyde pendant 12 minutes à 37°C avec agitation. La fixation est stoppée par l'ajout de 0.125 M de glycine et par

incubation pendant 10 minutes à 37°C avec agitation. Après deux lavages à l'aide de PBS froid, les tissus fixés sont lysés dans la solution I (0,25% triton, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES) à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 6 minutes à 3000 rpm à 4°C. La solution I est enlevée doucement pour ne pas perturber les culots de noyaux. Les noyaux sont ensuite homogénéisés dans la solution II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES) et centrifugés 6 minutes à 3000 rpm à 4°C. Les culots de noyaux sont ensuite homogénéisés dans une solution de lyse SDS (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1). Les solutions I, II et de lyse SDS ont été complémentées à l'aide de 1 mM PMSF (PMS123, Bioshop Canada Inc), 1 µg/mL d'aprotinine (APR600, Bioshop Canada Inc), 1 µg/mL de leupeptine (LEU001, BioShop Canada Inc) et de 1 µg/mL de pepstatine A (PEP605, Bioshop Canada Inc). Quatre µg d'anticorps ont été utilisés pour les ChIPs ER α , H3K27ac ou H3. Les qPCR ont été effectuées sur l'ADN immuno-précipité et quantifiées à l'aide d'une courbe standard dérivant de la quantité d'ADN total avant l'immuno-précipitation (Input). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 3.2.

	Forward	Reverse
mPgr enh 1	GCTCCAATGACTGTGTTCTCG	GACCTGTGAAAAGCTGGGGA
mPgr prom	GACAGGAGCTGACCAAGACC	TCAGTCATGACGACCCAAGC
mPgr enh 2	CAGCTGGGGAGTCTGGAAAA	GACATGAGGCAACCAGTCCA
mPdk4 enh	GAGGCTCAGTGCATCCTACC	CGGGAGGACGAGAGAGGTTA
ChIP Ctl neg	GAGCGCATGCTGTTTCCTTCTA	TTGGTACGCAAAGCCGAGAG
mPgr enh 2 -500	AGGCATTGTGCTCCACATCA	ACTGGTAGTCTGCAGGGTCT
mPgr enh 2 -350	GTTAGTGCCTTCCTGGACCC	GGCCCAGGCTGGTTTAGATT
mPgr enh 2 -150	AGCCTGGTTACTGCAAAGGG	GCTCTGCTTTGGAATGCTGT
mPgr enh 2 +150	CCTTCTTACGACTCATGGCGA	ATGAGCAGAGTGGCCTTTCA
mPgr enh 2 +200	CCATGAAAGGCCACTCTGCT	ATGGGCCATGACACTGATGT

Tableau 3.2 : Amorces de ChIP-qPCR utilisées dans cette étude

3.4.5. FAIRE ou extraction des éléments de régulation assistée par formaldéhyde

La technique du FAIRE utilise la chromatine isolée dans la technique du ChIP. À la place d'utiliser un anticorps, l'ADN déplété en nucléosome est extrait à l'aide de deux extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamyle (25:24:1) suivit d'une centrifugation à 12000 rpm pendant 5 minutes pour la première ou d'un transfert sur un tube « phase lock gel » (préalablement centrifuger 30 secondes à 12000 rpm). Après avoir bien homogénéisé le tube, les différentes phases sont séparées par centrifugation à 14000 rpm pendant 1 minute. Les qPCR ont été effectuées sur l'ADN ainsi isolé et quantifiées à l'aide d'une courbe standard dérivant de la quantité d'ADN total avant extraction (Input). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 3.2.

3.5. Bibliographie

1. Hao, R. H. *et al.* Gene expression profiles indicate tissue-specific obesity regulation changes and strong obesity relevant tissues. *Int. J. Obes.* **42**, 363–369 (2018).
2. Michalak, E. M., Burr, M. L., Bannister, A. J. & Dawson, M. A. The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2019). doi:10.1038/s41580-019-0143-1
3. Zhu, H., Wang, G. & Qian, J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 551–565 (2016).
4. You, D. *et al.* Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. *Elife* **6**, 1–20 (2017).
5. Multhaup, M. L. *et al.* Mouse-human experimental epigenetic analysis unmask dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell Metab.* **21**, 138–149 (2015).
6. Kim, M. & Costello, J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. *Exp. Mol. Med.* **49**, e322-8 (2017).
7. Bogdanović, O. & Lister, R. DNA methylation and the preservation of cell identity.

- Curr. Opin. Genet. Dev.* **46**, 9–14 (2017).
8. Agha, G. *et al.* Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue. *Int. J. Epidemiol.* **44**, 1277–1287 (2015).
 9. Kim, A. Y. *et al.* Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
 10. Newell-Fugate, A. E. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction* **153**, R133–R149 (2017).
 11. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J. & Hevener, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr. Rev.* **34**, 309–38 (2013).
 12. Xu, Y. & López, M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol. Metab.* **15**, 104–115 (2018).
 13. Hevener, A. L., Zhou, Z., Moore, T. M., Drew, B. G. & Ribas, V. The impact of ER α action on muscle metabolism and insulin sensitivity – Strong enough for a man, made for a woman. *Mol. Metab.* **15**, 20–34 (2018).
 14. Mukund, V., Mukund, D., Sharma, V., Mannarapu, M. & Alam, A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **119**, 13–22 (2017).
 15. Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M. & Korach, K. S. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Toxicol. Sci.* **80**, 14–25 (2004).
 16. Szkudelska, K. & Nogowski, L. Genistein-A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **105**, 37–45 (2007).
 17. Bilir, B. *et al.* Effects of genistein supplementation on genome-wide DNA methylation and gene expression in patients with localized prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **51**, 223–234 (2017).
 18. Xie, Q. *et al.* Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes. Chromosomes Cancer* **53**, 422–431 (2014).
 19. Day, J. K. *et al.* Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.* **132**, 2419S–2423S (2002).
 20. Sato, N. *et al.* Genome-wide dna methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation. *PLoS One* **6**, (2011).
 21. Svtelis, A., Gévry, N. & Gaudreau, L. Chromatin immunoprecipitation in mammalian cells. in *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein, DNA-Protein Interactions* (eds. Moss, T. & Leblanc, B.) **543**, 243–251 (Springer protocols, 2009).

Chapitre 4 : Discussion Générale

L'implication des œstrogènes dans le métabolisme énergétique n'est plus à prouver et de nombreux modèles ont décrit la protection qu'ils fournissent contre les pathologies métaboliques comme l'obésité ou le diabète de type II¹⁵. Ces études se concentrent souvent sur les effets à long terme des œstrogènes à l'aide de traitements durant un à plusieurs mois, sur des souris ovariectomisées, sur des souris KO pour *Esr1*, ou sur des femmes ménopausées. Elles ne tiennent alors pas compte des effets indirects que ces modèles peuvent engendrer. Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse se concentrent sur les effets directs, dynamiques et à court terme des œstrogènes afin d'identifier les gènes cibles directs de la voie E2/ER α et plus particulièrement dans le vWAT. Nous avons pour cela choisi pour une approche moléculaire permettant l'identification des sites de liaison de ER α à la chromatine et des gènes dont l'expression est affectée par une stimulation à court terme de l'E2.

Cette discussion générale et dernier chapitre de ce manuscrit de thèse s'articulera autour des questions qui ont pu être soulevées pendant ma thèse ainsi que des différents sujets qui y ont été abordés. La première partie concernera le second chapitre et l'identification moléculaire des cibles de la voie E2/ER α . Il y sera question de l'impact physiologique que ces cibles peuvent avoir sur le métabolisme énergétique. La seconde partie parlera des interactions existantes entre la signalisation de l'insuline et celle des œstrogènes en particulier dans le tissu adipeux. La troisième partie sera concentrée sur le lien qu'il peut exister entre la voie E2/ER α et l'obésité, une condition physiopathologique de plus en plus

présente dans la société occidentale. La dernière partie portera sur un aspect de ER α et de la signalisation des œstrogènes peu abordé durant ma thèse qui sont les impacts non-génomiques des œstrogènes et leurs collaborations potentielles avec la signalisation nucléaire de ER α . Finalement un paragraphe sera concentré à conclure ce manuscrit.

4.1. Rôles moléculaires de ER α dans le tissu adipeux blanc

De nombreux modèles ont étudié les effets des œstrogènes sur le métabolisme, consistant dans la plupart des cas en une perte ou une stimulation sur le long terme de la voie E2/ER α ^{15,270}. Les effets des œstrogènes dans le métabolisme énergétique se passant à plusieurs niveaux (centraux et périphériques), l'implication des œstrogènes dynamique et spécifique à un tissu particulier est noyé dans les interactions entre les tissus des modèles sur le long terme. Le rôle des œstrogènes sur la prise alimentaire est un bon exemple, jouant à la fois sur l'hypothalamus et sur la sécrétion de la leptine par le tissu adipeux, le résultat final direct est perdu par l'implication de plusieurs systèmes contrôlant la satiété^{15,270}. Le métabolisme énergétique cellulaire des tissus périphériques est aussi contrôlé à plusieurs niveaux par les œstrogènes, et spécifiquement dans le WAT, où la stimulation adrénergique y est stimulée au niveau central, mais aussi au niveau périphérique puisque l'expression des récepteurs adrénergiques est en partie contrôlée par les œstrogènes^{15,279}. L'analyse des cibles directes de la voie E2/ER α nous a alors semblé une bonne approche pour améliorer la compréhension de l'effet des œstrogènes sur le métabolisme énergétique, en particulier dans le vWAT.

4.1.1. Rôles de ER α dans le choix de la source d'énergie

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose sont des cibles préférentielles de la voie E2/ER α . La glycolyse est alors inhibée au profit de la β -oxydation des lipides dans la formation d'acétyl-CoA comme carburant pour le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est aussi affecté par la voie

E2/ER α , en partie l'étape de déshydrogénation de l'isocitrate par les IDH dépendante du NAD⁺, étape limitante du cycle de Krebs. L'activation par l'E2 de la transcription de gènes appartenant à la chaîne de transport des électrons tel que *Ucp1* par exemple suggère une spécialisation des mitochondries dans la dépense énergétique, comme observé dans le BAT ou le tissu adipeux beige. Ces données supposent donc que la voie E2/ER α favorise le maintien d'un phénotype mince et une distribution des dépôts adipeux gynoïdes en ciblant directement le catabolisme des lipides au sein du vWAT.

PDK4 est une protéine clé dans la décision de la provenance de l'acétyl-CoA entre le glucose et les acides gras dans le métabolisme cellulaire³⁸⁰. Elle est responsable de la phosphorylation inhibitrice de la sous-unité E1 α du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), empêchant ainsi la conversion du pyruvate en acétyl-CoA³⁸¹. Les PDKs sont au nombre de quatre, et PDK4 est la plus finement régulée en particulier par la voie de l'insuline. Ce qui en fait la plus importante au niveau du métabolisme énergétique cellulaire³⁸⁰. Les facteurs qui régulent l'expression du gène *Pdk4* sont impliqués d'une manière ou d'une autre dans le métabolisme énergétique : les facteurs FOXO1, PPARs (en particulier PPAR α), GR, les ERRs (récepteurs reliés aux œstrogènes) ou encore les TRs (récepteurs aux hormones thyroïdiennes)³⁸⁰. ER α n'avait pas été identifié précédemment comme pouvant cibler *Pdk4*, bien que l'E2 ait déjà été identifié comme pouvant stimuler l'expression de *Pdk4* dans le muscle squelettique et dans le foie sur le long terme chez la souris (après 60 jours de traitement)^{273,340}. Etant donné les nombreux facteurs régulant l'expression de *Pdk4*, dont *Ppara* et *Ppar γ* , connus pour être régulés par l'E2 sur le long terme, et que nos données (non-publiées) montrent qu'un traitement à l'E2 à court terme diminue l'expression de *Pdk4* dans le muscle squelettique, nous supposons que cet effet sur le long terme est indirect. Toujours dans le muscle squelettique, l'exercice physique prolongé et le repos qui s'en suit ont été montrés comme stimulant l'expression de *Pdk4*, favorisant l'utilisation des acides gras comme carburant afin de permettre le stockage du glucose sous forme de glycogène, utilisé de manière préférentielle pendant un exercice court³⁸². Ensemble, ces données nous poussent à penser que *Pdk4* est un gène central dans la signalisation des œstrogènes du vWAT et dans le choix des lipides comme source d'énergie.

Les PDKs ne sont pas les seuls facteurs capables d'inhiber le complexe PDH. Les concentrations en acétyl-CoA, en NADH et en ATP sont capables aussi de baisser l'activité du complexe, en particulier par acétylation de sa sous-unité E2, et d'augmenter les activités de deux autres PDKs : PDK1 et PDK2³⁸³. Les concentrations en acétyl-CoA et de NADH sont augmentées lors d'une activité accrue de la β -oxydation des lipides, induisant ainsi une inhibition indirecte du complexe PDH³⁸³. Or, nos données montrent une augmentation des expressions des acyl-CoA déshydrogénases (*Acadm*, *Acadl* et *Acadvl*) responsables de la première réaction de la β -oxydation, ainsi que de *Hadh* et *Hadhb* effectuant respectivement les troisième et quatrième réactions. Une activité accrue de la β -oxydation des lipides après la stimulation par l'E2 permettrait, en plus de l'augmentation de l'expression de *Pdk4*, une inhibition plus importante du complexe PDH par augmentation de la concentration en acétyl-CoA et en NADH.

Parallèlement, les expressions de gènes clés du cycle de Krebs comme *Idh3a*, *Aco2* ou *Mdh2* sont augmentées par une stimulation à l'E2. L'implication directe de ce résultat est une accélération du cycle puisque IDH3a participe à l'étape limitante du cycle de Krebs qu'est la déshydrogénation de l'isocitrate, permettant l'entrée dans le cycle de l'acétyl-CoA³⁸⁴. Indirectement, l'accélération du cycle de Krebs permet aussi de moduler le ratio entre les concentrations de NADH et de NAD⁺ en faveur du NADH, permettant alors potentiellement une autre inhibition indirecte du complexe PDH et de l'utilisation du glucose comme source d'acétyl-CoA. Ces premières données coïncident avec les effets de la voie E2/ER α sur le choix entre le glucose et les lipides comme source d'énergie.

Le rôle des œstrogènes dans le choix de la source d'énergie au niveau cellulaire semble être récurrent puisque le même constat est fait dans les hépatocytes. Chez les souris femelles en métœstrus comparées aux souris mâles, les acides aminés semblent être la source privilégiée pour le métabolisme énergétique cellulaire au dépend du glucose ou des lipides dans le foie³⁵⁶. L'augmentation de l'utilisation des acides aminés est corrélée avec une synthèse de lipides à longue chaîne accrue. Ce résultat n'est pas reproduit pour des souris femelles en proœstrus³⁵⁶ et est en contradiction avec les données montrant que la lipogenèse est inhibée par l'E2 dans les hépatocytes lors de traitement à long terme²⁷³. La raison la plus probable est qu'en phase de métœstrus, la concentration en

œstrogènes est plus faible et ne permet pas l'activation de ER α . En parallèle, ER α est activable par les acides aminés dans le foie³⁵⁴ et mon hypothèse est que lors de la phase de métœstrus, les acides aminés prennent le dessus pour l'activation de ER α et agissent comme un SERM : modulant ainsi l'expression des gènes cibles différemment qu'un ER α activé par l'E2.

Parallèlement, ce résultat dans le foie ouvre la porte à d'autres questionnements sur les actions de ER α dans les différents tissus impliqués dans le métabolisme énergétique. Il est clair avec nos résultats montrant que la voie E2/ER α a des effets différents entre les tissus, puisque le cistrome de ER α est spécifique au tissu. L'explication que nous avons apporté à ce phénomène est multiple et a déjà été discuté dans le premier chapitre : des isoformes de ER α différentes, des régions enhancers spécifiques au tissu mais aussi une expression particulière de cofacteurs et de partenaires de ER α entre les tissus. L'activation de ER α par les acides aminés dans le foie amène une autre dimension à ce phénomène. Premièrement, l'activation de ER α par un ligand non-classique tel que les acides aminés, le cholestérol³⁸⁵ ou un SERM quelconque pourrait entraîner une conformation non-classique permettant le recrutement de cofacteurs et de partenaires différents par rapport à E2. Deuxièmement, l'expression d'isoformes de ER α différents entre les tissus pourrait le rendre plus ou moins sensible à un agoniste et entraîner la réponse spécifique d'un tissu. Tout ceci est spéculatif mais ouvre la porte à la recherche de SERM activant ER α dans un tissu particulier, d'autant que ER α est sensible à de nombreux ligands dont certains sont naturellement présents dans l'organisme (acides aminés ou cholestérol).

4.1.2. Rôle de ER α dans le brunissement du vWAT

Le BAT et le tissu adipeux beige sont caractérisés par une dépense énergétique et une production de chaleur élevées. Ainsi, la β -oxydation des lipides est une fonction augmentée dans les adipocytes bruns et beiges permettant une dégradation accrue des lipides dans ce tissu³⁸⁶. Les mitochondries du BAT sont spécialisées dans la dépense énergétique afin de supporter l'oxydation des lipides, en particulier par la présence dans

le BAT et le tissu adipeux beige d'une protéine nommée UCP1^{386,387}. De manière intéressante, les données du second chapitre montrent que les gènes cibles de la voie E2/ER α sont impliqués dans ce qui fait ces spécificités du BAT et du tissu adipeux beige. Une corrélation peut être faite avec l'effet des traitements à long terme des œstrogènes sur les dépôts de WAT qui entraînent un brunissement des tissus^{304,388}. Nous supposons donc que la stimulation à l'E2 entraîne à court terme un brunissement du vWAT. En effet, nos données montrent que de nombreuses protéines mitochondriales dont UCP1 voit l'expression de leur gène augmentée par la voie E2/ER α . En parallèle de l'augmentation de l'expression des nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales (dont *Ucp1*), l'expression de *Pgc1 α* est aussi augmentée : cela peut signifier que la voie E2/ER α favorise à court terme la genèse de nouvelles mitochondries, ce qui peut être rapporté avec un brunissement du vWAT aussi. Nos résultats montrent que la voie de l'E2 et de ER α interviendrait directement dans cette transdifférenciation, puisqu'il est recruté à la chromatine proche de ces gènes cibles et permet leur surexpression 4 heures seulement après le début du traitement.

Le vWAT n'est pas un tissu homogène et plusieurs populations cellulaires y sont présentes. Bien que se ressemblant beaucoup, les adipocytes blancs et beiges sont profondément différents même sans stimulation par le froid. En effet, en condition de chaleur, les deux populations cellulaires semblent similaires avec une gouttelette lipidique occupant la majeure partie du cytoplasme, un noyau écrasé sur le côté de la cellule et peu de mitochondries. En condition de froid, seuls les adipocytes beiges subissent un changement majeur de leur physionomie, adoptant une structure cellulaire caractéristique du tissu adipeux brun avec de nombreuses petites gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries spécialisées contenant entre autres la protéine UCP1. Les adipocytes beiges sont néanmoins à la base très différents des adipocytes blancs puisqu'ils possèdent une mémoire épigénétique de leur capacité à devenir beige²⁰⁵. En effet, les adipocytes beiges possèdent les sites de liaison distaux, marqués par H3K4me1, des deux populations d'adipocytes blancs et bruns. Cela impliquerait dans nos résultats de prendre en compte cette particularité épigénétique des adipocytes beiges pour savoir si ER α pourrait avoir une spécificité d'action entre les deux populations d'adipocytes. En effet, est-ce que les sites de liaison de ER α à la chromatine autour de *Ucp1* ne sont

présents que dans les adipocytes beiges ? ou, plus généralement, est-ce que les cibles de la voie E2/ER α identifiées dans nos projets pourraient être spécifiques à l'une ou l'autre sous-population d'adipocytes ? Pour y répondre il faudrait trier les cellules du vWAT pour n'en sélectionner qu'une sous-population afin de voir l'effet spécifique à cette sous-population de la voie E2/ER α . Le marquage H3K4me1 spécifique des adipocytes beiges pourrait aussi permettre l'identification de motifs de facteurs de transcription particulier dont celui ER α .

Les résultats du troisième chapitre indiquent que l'obésité est associée à une inhibition de la voie E2/ER α dans le vWAT. En particulier, l'expression de *Ucp1*, comme pour les autres cibles de E2/ER α , n'est plus augmentée par un traitement à l'E2 dans les souris obèses. Comme pour la voie E2/ER α classique dans les souris non-obèses, il est possible que la méthylation de l'ADN et la fermeture de la chromatine à la transcription se produisent de manière spécifique dans les deux sous-populations d'adipocytes. Les éléments de liaison distaux présents dans les adipocytes beiges pourraient être ainsi touchés par la méthylation et ainsi affecter la transdifférenciation des adipocytes beiges. En complément, les sous-populations d'adipocytes beiges et blancs dérivent à partir d'un précurseur commun. Un changement épigénétique comme la méthylation de l'ADN survenant dans ces cellules précurseurs serait synonyme d'une transmission de ces marques dans les deux sous-populations d'adipocytes. À l'avenir, il serait alors intéressant d'identifier les impacts de l'obésité sur l'épigénome des préadipocytes du vWAT ainsi que les effets spécifiques sur les deux sous-populations beige et blanche. Ensemble, ces données soulèvent une limite majeure de nos projets puisque nos résultats ne montrent que les effets globaux dans le tissu de la méthylation de l'ADN et de la réponse à E2/ER α dans le dépôt de vWAT périgonadal, et la conséquence de cela est que nous ne différencions pas les effets spécifiques au niveau des sous-population d'adipocytes.

4.1.3. Liens avec la reproduction

La reproduction et en particulier la grossesse/gestation sont des processus énergétiquement coûteux que l'organisme doit prévoir. Le cycle menstruel ou œstral est le début de cette prévision : il est composé d'une phase de folliculogénèse avec un taux d'œstrogènes circulant élevé et une phase lutéale, après l'ovulation ou l'œstrus, avec un taux de progestérone élevé. La phase lutéale du cycle et les premiers mois de grossesse chez la femme sont ainsi associés avec une prise de poids importante au niveau des dépôts de tissus adipeux en vue de nourrir l'embryon et le fœtus. De manière intéressante, si aucune fécondation n'a eu lieu, l'organisme retourne vers une phase de folliculogénèse durant laquelle il est important de se départir du surplus de graisse accumulée pendant la phase lutéale du cycle. Le fort taux d'œstrogènes circulant durant cette phase y est probablement la cause principale et nos résultats sur le vWAT s'inscrivent entièrement dans ce schéma physiologique du cycle.

4.2. La voie E2/ER α et la voie de l'insuline dans le vWAT

Un des processus métaboliques peu abordé durant mes projets de thèse est la voie de l'insuline et ses interactions avec la voie E2/ER α , en particulier dans le vWAT. Contrairement au foie et au muscle squelettique où la voie de l'insuline est liée principalement au métabolisme du glucose, dans le WAT elle est plus liée à la fonction mitochondriale et au contrôle de la balance entre lipogénèse et lipolyse. En effet, dans le WAT, en activant mTORC1, la voie de l'insuline bloque la dégradation des TG en DG par une inhibition de ATGL, et favorise la lipogénèse par l'activation de SREBP1c^{238,389,390}. Inversement, une stimulation adrénergique et des récepteurs adrénergiques β , via l'activation de la PKA, entraîne l'inhibition de mTORC1 activant ainsi directement la lipolyse et inhibant indirectement la lipogénèse²³⁸. De manière intéressante, la balance entre ces deux stimulations est différente entre les dépôts de vWAT où la stimulation adrénergique est favorisée et les dépôts de scWAT où la voie de l'insuline est favorisée^{238,391}. Comme montré dans l'introduction et dans nos données, la voie des

œstrogènes et la voie β -adrénergique semblent collaborer dans le métabolisme des lipides, suggérant que la voie de l'insuline et des œstrogènes s'antagonisent, du moins à court terme dans le WAT.

Les impacts des œstrogènes sur la réponse à l'insuline et sur la voie de l'insuline sont beaucoup étudiés dans les tissus tels que le foie ou le muscle squelettique puisqu'ils sont les principaux répondeurs de cette hormone. Cependant, bien que le vWAT soit moins impliqué dans le métabolisme du glucose, il exprime aussi le récepteur à l'insuline. Des données non-publiées provenant de notre laboratoire impliquent au niveau transcriptomique la voie E2/ER α directement dans l'inhibition de la voie de l'insuline. Ainsi, une baisse de l'expression de *Irs2*, principal transducteur de la voie de l'insuline dans le vWAT, ainsi qu'une augmentation de l'expression des inhibiteurs de la voie *Socs1* et *Socs3* sont observées et nous amène à penser que les œstrogènes, contrairement à ce qui est observé dans le foie et le muscle squelettique, entraîne une résistance à l'insuline dans le vWAT^{235,392}. ER α avait déjà été associé avec l'activation de l'expression de *SOCS3* dans un modèle de cancer humain³⁹³. Parallèlement, l'expression des gènes *Stat3* et *Stat5a*, impliqués dans la réponse à l'inflammation et dans la résistance à l'insuline, est augmentée par un traitement à court terme d'E2 dans nos données non-publiées. Ce sont deux facteurs de transcription dont l'activation est stimulée par les récepteurs aux cytokines tels que le récepteur à l'IL6, mais aussi par la leptine ou par le récepteur à l'insuline lui-même^{214,394}. Ces deux facteurs permettent la transcription des gènes *Socs* induisant alors l'inhibition de la voie de l'insuline, et donc d'éteindre le signal du récepteur à l'insuline normalement après son activation. En complément de ces résultats, il a été identifié que l'E2 compétitionne avec l'insuline pour la liaison au récepteur à l'insuline *in vitro*³⁹⁵. Bien qu'aucune étude fonctionnelle ne soit faite sur ce sujet, il est possible de penser que l'E2 pourrait bloquer directement la voie de l'insuline dans le vWAT par liaison au récepteur à l'insuline. De plus, d'autres données non publiées de notre laboratoire supposent que la voie du glucose est favorisée à court terme dans le muscle squelettique puisque l'expression de *Pdk4* y est fortement diminuée par un traitement à l'E2.

Cela supposerait ainsi une spécialisation des tissus dans l'utilisation du glucose ou des lipides après une stimulation à l'insuline et impliquerait une nouvelle fois la voie E2/ER α dans le choix de la source d'énergie au niveau cellulaire. Ainsi, la source d'énergie favorisée dans le foie serait les acides aminés en metœstrus et les lipides en proœstrus, et dans les muscles squelettiques l'utilisation le glucose comme source d'énergie y serait préférentielle à l'utilisation des lipides. À l'inverse, dans les dépôts de WAT et en particulier de vWAT, la voie de l'insuline y serait inhibée par les œstrogènes inhibant ainsi le stockage des lipides survenant normalement après un repas et une stimulation de l'insuline, favorisant ainsi l'action des œstrogènes sur le catabolisme des lipides et sur la dépense énergétique décrite dans le second chapitre. Nos résultats ne sont que préliminaires, mais des calculs simples avec des traceurs de lipides ou de glycérol permettrait de confirmer cette hypothèse. En effet, la sensibilité à l'insuline du WAT spécifiquement est calculable par ces traceurs et permettent de sortir un score de résistance à l'insuline spécifique au niveau du tissu adipeux (AdipoIR)³⁹⁶. Un tel score nous permettrait de déterminer l'effet de la voie des œstrogènes sur l'efficacité de la voie de l'insuline dans le WAT. De plus, la capacité des œstrogènes à activer la PKA via deux récepteurs différents, ER α et GPER, laisse penser que l'action des œstrogènes sur la voie de l'insuline pourrait se faire à de nombreux niveaux : directement via la voie de signalisation associée à la PKA et indirectement via la transcription. Si les effets de la voie E2/ER α se confirment, cela montrerait une nouvelle fois la spécificité d'action des œstrogènes entre les différents tissus du métabolisme énergétique.

Récemment, un autre mode d'action du récepteur à l'insuline a été découvert. La liaison du récepteur à l'insuline à son ligand permet sa translocation dans le noyau et une interaction avec l'ARN pol II au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides notamment³⁹⁷. Bien que ces données aient été obtenues dans des hépatocytes, il est possible d'extrapoler ce résultat pour les autres tissus exprimant le récepteur à l'insuline dont le vWAT. Cela impliquerait ainsi une nouvelle interaction possible à explorer entre les voies de l'insuline et de E2/ER α , cette fois-ci au niveau de la chromatine.

4.3. Association entre l'obésité et la voie E2/ER α

Le chapitre 3 de ce manuscrit a permis une association entre le développement de l'obésité et la réponse aux œstrogènes. Une perte de sensibilité de la voie E2/ER α (par la perte de ER α ou de la sécrétion d'œstrogènes) est depuis longtemps associée avec une morbidité plus élevée de l'obésité^{15,270}. Cependant, aucune association inverse n'avait été démontrée. Bien entendu, beaucoup de questions restent en suspens telles que le mécanisme intervenant sous ce phénomène ou encore son implication dans la physiopathologie de l'obésité. Bien que le lien entre les pathologies métaboliques comme l'obésité et les modifications épigénétiques des tissus soit maintenant clair, il reste aussi énormément de zones floues à développer sur ce sujet³⁹⁸. Et comme nous l'avons montré dans l'introduction, une modification dans le patron de méthylation de l'ADN d'un tissu affecte généralement son programme de transcription, l'identité des cellules et ainsi sa fonction ainsi que ses capacités à répondre à un stimulus externe^{399,400}.

Nous avons alors utilisé *Pgr* comme gène modèle à la réponse aux œstrogènes dans le vWAT et constaté une diminution de réponse à l'E2 de ce gène. Comme décrit dans le chapitre 3, cette diminution est corrélée avec une perte de la liaison de ER α aux éléments régulateurs identifiés précédemment, ainsi qu'avec une méthylation accrue de ces éléments. La perte de marques d'histones associées à l'activation ainsi qu'une fermeture de l'ADN confirment les résultats précédents. Ces résultats nous ont permis d'avancer que l'obésité affecte la réponse aux œstrogènes à partir de changements épigénétiques profonds associées sûrement à la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN dans le vWAT de souris obèses a déjà été associée à une augmentation de l'expression de deux ADN méthyle-transférases DNMT1 et DNMT3a^{401,402}. Bien que nos données ne montrent pas une surexpression significative de *Dnmt1* et *Dnmt3a*, un lien clair avec ER α semble se dessiner dans le vWAT puisqu'une stimulation aux œstrogènes réduit l'expression de ces gènes. Ce dernier phénomène peut être relié avec les impacts que la génistéine, un SERM, entraîne sur le patron de méthylation de l'ADN de tissus comme le foie ou la prostate^{403,404}. À l'inverse, nos données montrent une méthylation de l'ADN accrue de l'un des promoteurs de *Esr1* dans le vWAT des souris obèses. À la lumière de ces derniers

résultats, il est possible de penser que le développement de l'obésité et la voie E2/ER α pourraient être intimement liés dans le vWAT, s'influençant l'un et l'autre.

Les régions génomiques recrutant ER α et associées avec les processus des acides gras ainsi que dans ceux de la différenciation adipocytaire brune et blanche sont retrouvées majoritairement avec une méthylation de l'ADN accrue dans les souris obèses. Les données de méthylation de l'ADN que nous avons utilisées proviennent de puces à ADN, ce qui implique que toutes les régions génomiques n'y sont pas représentées : les régions représentées se composent majoritairement de celles contenant des îlots CpG. Ces données nous ont permis de conclure que la méthylation de l'ADN inhibe la fixation de ER α à la chromatine et ainsi diminue la transcription de ses gènes cibles. À l'opposé, la méthylation ponctuelle de site de liaison à des facteurs de transcription a déjà été associée à une augmentation du recrutement du facteur et à l'activation de la transcription⁷⁸. En particulier, CEBPB, que nous avons associé avec ER α dans le premier chapitre, est l'un de ces facteurs de transcription. Ainsi, nous pouvons supposer que l'étude globale de la méthylation de l'ADN pourrait permettre l'identification de tels sites auxquels ER α et CEBPB se lieraient de manière plus efficace en cas de méthylation. Inversement, certains sites pourraient être déméthylés lors du développement de l'obésité et perdre ainsi le recrutement de ER α et de CEBPB. Des ChIP-seq de ER α et de CEBPB combinés à une étude globale de la méthylation de l'ADN permettraient ainsi d'observer l'interaction de ces facteurs avec la chromatine méthylée. Néanmoins, l'association entre CEBPB et ER α est encore présomptive et le rôle de ce couple dans la transcription et le métabolisme énergétique cellulaire du vWAT reste à déterminer.

Comme mentionné plus tôt, un des promoteurs du gène *Esr1* semble plus méthylé dans la condition obèse dans les données issues de la puce à ADN que nous avons utilisée pour notre analyse. Ce dernier résultat est corroboré par une quantité de ER α diminuée dans le vWAT des souris obèses par rapport aux souris saines, suggérant probablement une inhibition à plusieurs niveaux de la voie E2/ER α dans le vWAT. Malgré cela, l'expression de *Esr1* est restaurée après un traitement à l'E2 et est équivalente entre les souris, peu importe le régime, n'expliquant ainsi pas la différence de fixation de ER α aux enhancers. De plus, le rôle des DNMTs dans la méthylation du gène *ESR1* dans les

cancers du seins est aussi connue⁴⁰⁵, mais la question que j'aimerais poser ici est quel est le rôle de ER α dans la méthylation de l'ADN dans le vWAT ? La liaison et le lien fonctionnel entre ER α et DNMT3b ont déjà été montrés dans un modèle de cancer du sein⁴⁰⁶ mais quel peut être le rôle d'une telle liaison si elle existe dans le vWAT ? Se pourrait-il que ER α soit impliqué dans la méthylation de ses propres enhancers dans le développement de l'obésité ? ER α est souvent associé avec l'augmentation de l'expression de ses cofacteurs^{136,407}, et l'obésité peut être associée avec un faible niveau d'œstrogènes sanguin^{15,408}. Il est donc possible de penser que pendant le développement de l'obésité, un déséquilibre se produirait entre les coactivateurs et les corépresseurs liés à ER α , favorisant alors une méthylation de ses sites de liaison médiée par un manque d'activation du récepteur et par une liaison accrue de ER α aux DNMTs. La causalité entre la résistance aux œstrogènes et le développement de l'obésité nécessite alors d'être approfondie.

4.4. Effets non-génomiques de ER α

Les résultats présentés dans les chapitres de ce manuscrit de thèse se concentrent sur les effets génomiques de la voie E2/ER α , et leurs implications dans le métabolisme énergétique cellulaire du vWAT. Or de nombreux exemples existent sur les impacts non-génomiques de ER α dans le métabolisme énergétique, par la présence de ER α à la membrane cytoplasmique ou encore par la localisation de ER α dans les mitochondries. De plus, GPER est un récepteur couplé aux protéines G répondant aux œstrogènes favorisant aussi les effets non-génomiques de l'E2. Le but des paragraphes qui suivent est de démontrer que la voie E2/ER α a des rôles importants dans la transcription, mais que ces effets pourraient être appuyés voir amplifiés par de nombreuses actions non-génomiques.

4.4.1. Localisation de ER α dans les mitochondries

Il est intéressant de noter que ER α a déjà été impliqué dans la β -oxydation des lipides de manière non-génomique. En effet, dans les cellules MCF7 (ER α^+) et dans les cellules MDA-MB-231 (ER α^-) transfectées avec le gène *Esr1*, il a été montré que ER α est présent dans les mitochondries et interagit avec HADHB influençant ainsi la β -oxydation des lipides sans affecter l'expression du gène *Hadhb*⁴⁰⁹. Il a aussi été identifié que ER β interagit avec HADHB mais comme aucun agoniste spécifique de ER α ou de ER β a été utilisé, les effets sur la β -oxydation des lipides de ces interactions peuvent être le fruit de l'activation de ER α autant que de l'activation de ER β ⁴¹⁰. Une grande partie des gènes cibles identifiés par notre étude dans le vWAT, dont *Hadhb* fait partie, ont des protéines mitochondriales comme produit. De plus, l'isoforme de 36 kDa de ER α a été localisé majoritairement dans les mitochondries dans des cellules musculaires lisses utérines⁴¹¹. Il serait tout à fait vraisemblable de penser que la voie E2/ER α influencerait la β -oxydation des lipides à deux niveaux : au niveau transcriptionnel, en stimulant l'expression des gènes impliqués et au sein de la mitochondrie, afin de moduler l'activité des enzymes, bien que les processus qui seraient impliqués soient encore inconnus. L'exemple de HADHB, dont le gène et la protéine semblent être les cibles de ER α pourrait-il être généralisé à une partie des cibles de la voie E2/ER α : peuvent-elles être affectées autant au niveau de la transcription de leurs gènes qu'au niveau de leur activité. Est-il possible ensuite de généraliser ce résultat aux autres cibles transcriptionnelles de ER α dont les protéines sont impliquées dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons et localisées elles aussi dans les mitochondries ? Ainsi, l'étude de l'interactome de ER α , en combinaison avec les expériences de ChIP-seq faites ici, permettraient d'envisager une collaboration entre un ER α nucléaire et un ER α mitochondrial.

4.4.2. Localisation de ER α à la membrane cytoplasmique

La localisation de ER α à la membrane cytoplasmique facilite la signalisation rapide en réponse aux œstrogènes et est impliquée dans de nombreux processus métaboliques,

en particulier dans les cellules β des îlots de Langerhans, promouvant alors la survie et la synthèse d'insuline^{357,361,365,366}. Les souris ER α KO développent une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose, et cet effet est en grande partie dû à la présence de ER α au noyau, mais aussi dans une plus faible proportion au ER α membranaire⁴¹². Parallèlement, la prise de poids survenant avec la déplétion de ER α membranaire dans les souris NOER (Nuclear Only ER α) est atténuée par rapport aux souris ER α KO⁴¹³. Alors que dans les souris MOER (Membrane Only ER α), ne possédant pas de ER α nucléaire, cette prise de poids est similaire à ce qui est observé dans les souris ER α KO⁴¹⁴. Ces données montrent ainsi que le ER α nucléaire joue un rôle prédominant sur la prise de poids et la sensibilité à l'insuline par rapport au ER α membranaire, mais aussi que le ER α membranaire a un rôle non négligeable dans le métabolisme énergétique et qu'une collaboration entre les deux localisations de ER α est envisageable. Le tissu sur lequel se sont concentré les études sur l'impact des ER α membranaire et nucléaire sur la sensibilité à l'insuline est le foie, mais les augmentations de poids visibles sur le poids total et sur le poids des dépôts de tissu adipeux peuvent affecter de manière indirecte la sensibilité à l'insuline^{413,414}. Ces études utilisent des KO totaux des ER α nucléaire et membranaire ne permettant ainsi pas de différencier les impacts directs des différents tissus. Néanmoins, les souris LERKO ne deviennent pas obèses et l'impact sur la sensibilité de l'insuline du KO ER α spécifique dans le foie est minime à l'échelle de l'organisme, suggérant fortement une nouvelle fois que l'impact de la délétion du ER α nucléaire sur la sensibilité à l'insuline est indirect. Néanmoins, l'impact des délétions des ER α membranaire et nucléaire sur le métabolisme énergétique est clair : les souris deviennent obèses au même titre que les souris ER α KO.

Les mécanismes impliquant une collaboration entre les deux sont peu décrits mais existent. Comme décrit dans l'introduction, dans les cellules β des îlots de Langerhans, ER α membranaire induit la dégradation d'une protéine nommée UBC6e alors que ER α inhibe l'expression de son gène³⁶⁶. La collaboration entre les deux induit une dégradation de la proinsuline mal repliée et ainsi stimule la survie des cellules. Dans d'autres modèles, des expositions prolongées à l'E2 de cellules de cancers du sein ou de prostate ont montré que ER α membranaire est capable de transactiver les récepteurs aux hormones de croissance (GFR), comme le récepteur du facteur de croissance insuline-like

(IGF1R)¹⁵⁹ ou le récepteur au facteur de croissance épidermal (EGFR)¹⁵⁸. Cette transactivation des GFR par ER α et l'E2 est ensuite nécessaire pour l'activation de cascades de signalisation comme celle des MAPK ou celle de AKT^{158,159}. En revenant dans un contexte de vWAT exprimant des GFR comme IGF1R par exemple, l'activation de ER α membranaire pourrait transactiver ces GFR et par l'activation de la voie des MAPK, activer ER α par phosphorylation potentialisant ainsi son activation par la liaison directe à son ligand. Le lien entre les GFR et la voie AKT pourrait tout aussi bien interférer avec la voie de l'insuline où la phosphorylation des AKT constitue un passage obligé. En parallèle, IGF1 est une hormone dont la sécrétion par le foie est modulée par la voie E2/ER α , mettant ainsi un autre niveau de régulation de l'E2 entre les différents tissus métabolique³⁵¹. Ces hypothèses reposent sur des résultats observés dans des cellules de cancer du sein ou de la prostate, mais comme le suppose le premier chapitre de ce manuscrit, chaque tissu répond d'une manière particulière aux œstrogènes, ce qui pourrait être vrai aussi pour ER α membranaire qui pourrait être couplé à différentes protéines G en fonction du modèle et du tissu étudié par exemple. L'étude du ER α membranaire du vWAT ainsi que celui des autres tissus impliqués dans le métabolisme énergétique pourrait être une voie d'étude dans le futur, permettant ainsi de décortiquer la signalisation complète de l'E2 dans chaque tissu.

GPER étant un récepteur couplé à une protéine G, est lui aussi présent à la membrane cytoplasmique et permettrait aussi l'activation de voies de signalisation non-génomiques. Etant donné que les souris femelles GPERKO ne deviennent obèses qu'après l'âge de 16 semaines, les effets de GPER sur nos données devraient être limités puisque les souris utilisées dans le chapitre 1 sont âgées de 10 à 12 semaines²⁸². Pourtant, après l'âge de 16 semaines, la physiopathologie par tissu de la délétion du gène est très similaire à ce qu'on observe dans les souris ER α KO. De plus, contrairement aux souris sauvages, les souris GPERKO traitées avec de l'E2 n'ont pas d'amélioration de leur tolérance au glucose suggérant que GPER est impliqué dans ce phénomène et que ER α ne l'est pas²⁸². Une activation de la voie ERK a été aussi observée au niveau des cellules de l'hypothalamus dans les souris GPERKO suggérant comme ER α un rôle central sur la prise de nourriture ou sur la dépense énergétique²⁸². La question qui pourrait se poser

c'est qu'étant donné la ressemblance entre la physiopathologie des souris GPERKO et ER α KO, existe-t-il un lien fonctionnel ou une synergie entre les deux récepteurs ?

4.5. Conclusion

Nous nous sommes concentrés dans ce manuscrit sur l'organisme femelle, mais la signalisation de l'E2 est aussi très présente chez l'organisme mâle. Pour preuve, les souris mâles ER α KO ou GPERKO deviennent obèses autant que les souris femelles^{280,282}. Etant donné que la concentration en œstrogènes circulant est très faible chez l'homme, l'aromatisation de la testostérone en E2 est alors un passage obligé pour les tissus périphériques pour activer la signalisation E2/ER α . En parallèle, la testostérone a aussi un effet bénéfique sur le maintien d'un phénotype mince chez le mâle, mais le KO de ER α ou de l'aromatase entraînent un phénotype de surpoids et de désordres métaboliques plus prononcé qu'un KO du récepteur aux androgènes^{31,280,415}.

Le tissu adipeux mâle plus spécifiquement exprime ER α d'une manière comparable à ce qui est retrouvé chez la femelle⁴¹⁶ et est présent autant dans les préadipocytes que les adipocytes matures⁴¹⁷. D'une manière équivalente aux femelles, la gonadectomie provoque une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques tels que *Fas* ou *Srebf1*⁴¹⁸. De manière intéressante, une complémentation en testostérone reverse ce phénotype d'une manière dépendante de l'aromatase, impliquant ainsi directement les œstrogènes dans ce phénomène⁴¹⁸. Ces résultats impliquent donc une collaboration entre la signalisation des œstrogènes et celle des androgènes chez le mâle. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la famille des récepteurs stéroïdiens, dont le gène ancestral AncSR1 est très proche de ER α , est apparu plus tôt dans l'évolution par rapport aux gènes responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes. AncSR1 répondant au cholestérol, était supposé servir de senseur dans le métabolisme énergétique. Au fil de l'évolution, ce système s'est adapté pour la reproduction et le cycle menstruel/œstral chez la femme/femelle. Les hommes/mâles ne disposant plus de concentration d'œstrogènes circulant importante ont adapté le système pour pouvoir bénéficier des effets de ER α sur le métabolisme énergétique. L'obésité étant une pathologie qui prend

une part de plus en plus importante dans nos sociétés modernes, l'étude plus rigoureuse des impacts de la voie des œstrogènes et une éventuelle collaboration avec celle des androgènes pourrait mener dans le futur à des traitements hormonaux contre l'obésité.

Bibliographie

1. Nebert, D. W., Wikvall, K. & Miller, W. L. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, (2013).
2. Miller, W. L. Steroidogenesis: unanswered questions. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 771–793 (2017).
3. Guengerich, F. P., Waterman, M. R. & Egli, M. Recent structural insights into cytochrome P450 function. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 625–640 (2016).
4. Boron, W. & Boulpaep, E. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*, elsevier/saunders. (2003).
5. Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **19**, 207–226 (1997).
6. Thornton, J., Need, E. & Crews, D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* **301**, 1714–7 (2003).
7. Heldring, N. *et al.* Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* **87**, 905–931 (2007).
8. Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5925–5930 (2002).
9. Jensen, E. V. On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* **6**, 47–60 (1962).
10. Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. & Frackelton, A. R. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1649–1660 (2000).
11. Prossnitz, E. R. & Barton, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 715–726 (2011).

12. Kuiper, G. G. *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863–70 (1997).
13. Brandenberger, A. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. **82**, 3509–3512 (1997).
14. Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.-A. & Korach, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology* **138**, 4613–4621 (1997).
15. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J. & Hevener, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr. Rev.* **34**, 309–38 (2013).
16. Keating, N. L., Cleary, P. D., Rossi, A. S., Zaslavsky, A. M. & Ayanian, J. Z. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **182**, 217 (1999).
17. Blaustein, J. D. & Wade, G. N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol. Behav.* **17**, 201–208 (1976).
18. Wallen, W. J., Belanger, M. P. & Wittnich, C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J. Nutr.* **131**, 2351–7 (2001).
19. Gao, Q. *et al.* Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat. Med.* **13**, 89–94 (2007).
20. Geary, N. *et al.* Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice E2. *Endocrinology* **142**, 4751–4757 (2001).
21. Simpson, E. R. *et al.* Aromatase—A Brief Overview. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 93–127 (2002).

22. Wilson, E. M. & French, F. S. Properties of androgen receptors of pediatrics. *J. Biol. Chem.* **251**, 5620–5629 (1976).
23. Schiffer, L., Arlt, W. & Storbeck, K. H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* **465**, 4–26 (2018).
24. Thigpen, A. E. *et al.* Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* **92**, 903–910 (1993).
25. Wilson, J. D., Griffin, J. E. & Russell, D. W. Steroid 5 α -reductase 2 Deficiency. *Endocr. Rev.* **14**, 577–593 (1993).
26. Kelly, D. M. & Jones, T. H. Testosterone and obesity. *Obes. Rev.* **16**, 581–606 (2015).
27. Gapstur, S. M. *et al.* Serum androgen concentrations in young men: A longitudinal analysis of associations with age, obesity, and race. The CARDIA male hormone study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 1041–1047 (2002).
28. Jensen, T. K. *et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil. Steril.* **82**, 863–870 (2004).
29. McInnes, K. J., Corbould, A., Simpson, E. R. & Jones, M. E. Regulation of adenosine 5',monophosphate-activated protein kinase and lipogenesis by androgens contributes to visceral obesity in an estrogen-deficient state. *Endocrinology* **147**, 5907–5913 (2006).
30. Movérare-Skrtic, S. *et al.* Dihydrotestosterone treatment results in obesity and altered lipid metabolism in orchidectomized mice. *Obesity* **14**, 662–672 (2006).
31. Fan, W. Q. *et al.* Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* **54**, 1000–1008 (2005).
32. Lin, H. Y. *et al.* Insulin and leptin resistance with hyperleptinemia in mice lacking androgen receptor. *Diabetes* **54**, 1717–1725 (2005).
33. Corbould, A. Effects of androgens on insulin action in women : is androgen excess

a component of female metabolic syndrome ? *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **24**, 520–532 (2008).

34. Ding, E. L., Song, Y., Malik, V. S. & Liu, S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes. *Jama* **295**, 1288 (2006).
35. Varlamov, O., Bethea, C. L. & Roberts, C. T. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–7 (2015).
36. Campbell, S. E. & Febbraio, M. A. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am. J. Physiol. Metab.* **282**, E1139–E1146 (2002).
37. Stelmanska, E. & Swierczynski, J. Up-regulation of lipogenic enzyme genes expression in inguinal white adipose tissue of female rats by progesterone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **134**, 37–44 (2013).
38. Stelmanska, E., Szrok, S. & Swierczynski, J. Progesterone-induced down-regulation of hormone sensitive lipase (Lipe) and up-regulation of G0/G1 switch 2 (G0s2) genes expression in inguinal adipose tissue of female rats is reflected by diminished rate of lipolysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **147**, 31–39 (2014).
39. Lof, M. *et al.* Dietary fat intake and gestational weight gain in relation to estradiol and progesterone plasma levels during pregnancy: A longitudinal study in Swedish women. *BMC Womens. Health* **9**, 1–9 (2009).
40. Talbert, P. B. & Henikoff, S. Histone variants on the move: Substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 115–126 (2017).
41. Luger, K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
42. Song, F. *et al.* Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science (80-.)*. **344**, 376–380 (2014).
43. Bertin, A., Mangenot, S., Renouard, M., Durand, D. & Livolant, F. Structure and phase diagram of nucleosome core particles aggregated by multivalent cations.

Biophys. J. **93**, 3652–3663 (2007).

44. Yang, Z. & Hayes, J. J. The divalent cations Ca²⁺ and Mg²⁺ play specific roles in stabilizing histone-DNA interactions within nucleosomes that are partially redundant with the core histone tail domains. *Biochemistry* **50**, 9973–9981 (2011).
45. Prakash, K. & Fournier, D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *BioSystems* **164**, 49–59 (2018).
46. Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P. & Bradbury, E. M. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* **57**, 449–457 (1989).
47. Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P. & Bradbury, E. M. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. *J. Biol. Chem.* **268**, 305–314 (1993).
48. Mathis, D. J., Oudet, P., Wasylyk, B. & Chambon, P. Effect of histone acetylation on structure and in vitro transcription of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3523–3548 (1978).
49. Morinière, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664–668 (2009).
50. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1037–1043 (2004).
51. Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science* (80-.). **144**, 559 (1964).
52. Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–37 (2007).
53. Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N. & Shinkai, Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J.* **26**, 3346–3359 (2007).
54. Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B. D. & Lieb, J. D. Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9447–9459 (2005).

55. Ekwall, K. Epigenetic control of centromere behavior. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 63–81 (2007).
56. Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116–1122 (2005).
57. Birney, E. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799–816 (2007).
58. Koch, C. M. *et al.* The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res.* **17**, 691–707 (2007).
59. Heintzman, N. D. *et al.* Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**, 108–112 (2009).
60. Creighton, M. P. *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21931–21936 (2010).
61. Bitterge, B. & Schneider, R. Histone variants: Key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* **356**, 457–466 (2014).
62. Chakravarthy, S. & Luger, K. The histone variant macro-H2A preferentially forms 'hybrid nucleosomes'. *J. Biol. Chem.* **281**, 25522–25531 (2006).
63. Thakar, A. *et al.* H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: Biochemical and biophysical studies. *Biochemistry* **48**, 10852–10857 (2009).
64. Yoda, K. *et al.* Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 7266–7271 (2000).
65. Rogakou, E. P. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858–5868 (1998).
66. Goldberg, A. D. *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**, 678–691 (2010).
67. Chen, P. *et al.* H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.* **27**, 2109–2124 (2013).

68. Jin, C. & Felsenfeld, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1519–1529 (2007).
69. Chow, C.-M. *et al.* Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* **6**, 354–60 (2005).
70. Kraushaar, D. C. *et al.* Genome-wide incorporation dynamics reveal distinct categories of turnover for the histone variant H3.3. *Genome Biol.* **14**, 1 (2013).
71. Pradhan, S. K. *et al.* EP400 deposits H3.3 into promoters and enhancers during gene activation. *Mol. Cell* **61**, 27–38 (2016).
72. Nekrasov, M. *et al.* Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1076–1083 (2012).
73. Jin, C. *et al.* H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark ‘nucleosome-free regions’ of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* **41**, 941–945 (2009).
74. Brunelle, M. *et al.* The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9742–9756 (2015).
75. Wang, Q. *et al.* Histone variants H2A.Z and H3.3 coordinately regulate PRC2-dependent H3K27me3 deposition and gene expression regulation in mES cells. *BMC Biol.* **16**, 1–18 (2018).
76. Bird, A. P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 1499–1504 (1980).
77. Deaton, A. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).
78. Zhu, H., Wang, G. & Qian, J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 551–565 (2016).
79. Goll, M. G. & Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481–514 (2005).

80. Laisné, M., Gupta, N., Kirsh, O., Pradhan, S. & Defossez, P.-A. Mechanisms of DNA methyltransferase recruitment in mammals. *Genes (Basel)*. **9**, e617 (2018).
81. Guttman, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223–227 (2009).
82. Illingworth, R. S. *et al.* Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* **6**, e1001134 (2010).
83. Yan, H. *et al.* Chromatin modifications and genomic contexts linked to dynamic DNA methylation patterns across human cell types. *Sci. Rep.* **5**, 8410 (2015).
84. Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**, 125–9 (2008).
85. Conerly, M. L. *et al.* Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res.* **20**, 1383–1390 (2010).
86. Zhang, X. Y. *et al.* Binding sites in mammalian genes and viral gene regulatory regions recognized by methylated DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6253–6260 (1990).
87. Saito, M. & Ishikawa, F. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J. Biol. Chem.* **277**, 35434–35439 (2002).
88. De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V. & Boon, T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7327–7335 (2015).
89. Rishi, V. *et al.* CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20311–20316 (2010).
90. Prokhortchouk, A. *et al.* The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* **15**, 1613–1618 (2001).

91. Quenneville, S. *et al.* In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell* **44**, 361–372 (2011).
92. Liu, Y., Toh, H., Sasaki, H., Zhang, X. & Cheng, X. An atomic model of Zfp57 recognition of CpG methylation within a specific DNA sequence. *Genes Dev.* **26**, 2374–2379 (2012).
93. Spruijt, C. G. *et al.* Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **152**, 1146–59 (2013).
94. Bahar Halpern, K., Vana, T. & Walker, M. D. Paradoxical role of DNA methylation in activation of FoxA2 gene expression during endoderm development. *J. Biol. Chem.* **289**, 23882–23892 (2014).
95. Hantusch, B., Kalt, R., Krieger, S., Puri, C. & Kerjaschki, D. Sp1/Sp3 and DNA-methylation contribute to basal transcriptional activation of human podoplanin in MG63 versus Saos-2 osteoblastic cells. *BMC Mol. Biol.* **8**, 1–24 (2007).
96. Niesen, M. I. *et al.* Activation of a methylated promoter mediated by a sequence-specific DNA-binding protein, RFX. *J. Biol. Chem.* **280**, 38914–38922 (2005).
97. Cavallini, B., Huet, J., Plassat, J. L., Sentenac, A. & Egly, J. M. A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor. *Nature* **334**, 77–80 (1988).
98. Sainsbury, S., Bernecky, C. & Cramer, P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 129–143 (2015).
99. Basehoar, A. D., Zanton, S. J. & Pugh, B. F. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* **116**, 699–709 (2004).
100. Rhee, H. S. & Pugh, B. F. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* **483**, 295–301 (2012).
101. Juo, Z. S. *et al.* How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.* **261**, 239–254 (1996).
102. Stargell, L. A., Ogg, R. C., Adkins, J. N., Robinson, M. M. & Lumb, K. J.

- Transcriptional activity of the TFIIA four-helix bundle in vivo. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **43**, 227–232 (2001).
103. Ha, I. *et al.* Multiple functional domains of human transcription factor IIB: Distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev.* **7**, 1021–1032 (1993).
 104. Barberis, A., Muller, C. W., Harrison, S. C. & Ptashne, M. Delineation of two functional regions of transcription factor TFIIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 5628–5632 (2006).
 105. Deng, W. & Roberts, S. G. E. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIIB. *Genes Dev.* **19**, 2418–2423 (2005).
 106. Conaway, R. C., Garrett, K. P., Hanley, J. P. & Conaway, J. W. Mechanism of promoter selection by RNA polymerase II: mammalian transcription factors alpha and beta gamma promote entry of polymerase into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 6205–6209 (2006).
 107. Inostroza, J., Flores, O. & Reinberg, D. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **266**, 9304–9308 (1991).
 108. Maxon, M. E., Goodrich, J. A. & Tjian, R. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: A model for promoter clearance. *Genes Dev.* **8**, 515–524 (1994).
 109. Greber, B. J., Toso, D. B., Fang, J. & Nogales, E. The complete structure of the human TFIIH core complex. *Elife* **8**, 1–29 (2019).
 110. Gibbons, B. J. *et al.* Subunit architecture of general transcription factor TFIIH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 1949–1954 (2012).
 111. Robinson, P. J. *et al.* Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell* **166**, 1411–1422.e16 (2016).
 112. Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 170–182 (2014).

113. Zaret, K. S. & Mango, S. E. Pioneer transcription factors, chromatin dynamics, and cell fate control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **37**, 76–81 (2016).
114. Scruggs, B. S. *et al.* Bidirectional transcription arises from two distinct hubs of transcription factor binding and active chromatin. *Mol. Cell* **58**, 1101–1112 (2015).
115. Meng, H. & Bartholomew, B. Emerging roles of transcriptional enhancers in chromatin looping and promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **293**, 13786–13794 (2018).
116. Maniatis, T., Goodbourn, S. & Fischer, J. A. Regulation of inducible and tissue-specific expression. *Science (80-.)*. **236**, 1237–1245 (1987).
117. Cirillo, L. A. *et al.* Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279–89 (2002).
118. Iwafuchi-Doi, M. & Zaret, K. S. Cell fate control by pioneer transcription factors. *Development* **143**, 1833–1837 (2016).
119. Fiedler, M. *et al.* Decoding of methylated Histone H3 tail by the pygo-BCL9 Wnt signaling complex. *Mol. Cell* **30**, 507–518 (2008).
120. Li, Z. *et al.* Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell* **151**, 1608–1616 (2012).
121. Becker, J. S., Nicetto, D. & Zaret, K. S. H3K9me3-dependent heterochromatin: Barrier to cell fate changes. *Trends Genet.* **32**, 29–41 (2016).
122. Lai, X., Verhage, L., Hugouvieux, V. & Zubieta, C. Pioneer factors in animals and plants—colonizing chromatin for gene regulation. *Molecules* **23**, 1–22 (2018).
123. de Santa, F. *et al.* A large fraction of extragenic RNA Pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
124. Kim, T. K. *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182–187 (2010).
125. Noonan, J. P. & McCallion, A. S. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 1–23 (2010).

126. Eick, G. N. & Thornton, J. W. Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **334**, 31–38 (2011).
127. Busillo, J., Rhen, T. & Cidlowski, J. Steroid hormone action. in *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology (Seventh Edition)* 93–107 (Elsevier, 2014). doi:10.1007/s00018-009-0112-5
128. Levin, E. R. & Hammes, S. R. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 783–797 (2016).
129. Magnani, L. & Lupien, M. Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 633–641 (2014).
130. Lupien, M. *et al.* FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* **132**, 958–970 (2008).
131. Renoir, J. M., Radanyi, C., Faber, L. E. & Baulieu, E. E. The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 10740–10745 (1990).
132. Segnitz, B. & Gehring, U. Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2179–2183 (2006).
133. Tecalco-Cruz, A. C., Pérez-Alvarado, I. A., Ramírez-Jarquín, J. O. & Rocha-Zavaleta, L. Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cell. Signal.* **34**, 121–132 (2017).
134. Kulakosky, P. C., Mccarty, M. A., Jernigan, S. C., Risinger, K. E. & Klinge, C. M. Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 137–152 (2002).
135. Métivier, R. *et al.* Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751–63 (2003).
136. Carroll, J. S. *et al.* Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33–43 (2005).

137. Magnani, L., Ballantyne, E. B., Zhang, X. & Lupien, M. PBX1 genomic pioneer function drives ER α signaling underlying progression in breast cancer. *PLoS Genet.* **7**, 1–15 (2011).
138. Holmes, K. A. *et al.* Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2748–2753 (2012).
139. Tan, S. K. *et al.* AP-2 γ 3 regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J.* **30**, 2569–2581 (2011).
140. Theodorou, V., Stark, R., Menon, S. & Carroll, J. S. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Res.* **23**, 12–22 (2013).
141. Jozwik, K. M. & Carroll, J. S. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 381–385 (2012).
142. Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P. & Sassone-Corsi, P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. *Cell* **63**, 1267–1276 (1990).
143. Philips, A., Chalbos, D. & Rochefort, H. Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor- induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and c-jun synthesis [published erratum appears in J Biol Chem 1993 Dec 5;268(34):26032]. *J Biol Chem* **268**, 14103–14108 (1993).
144. Kraus, W. L. & Kadonaga, J. T. P300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev.* **12**, 331–342 (1998).
145. Zwart, W. *et al.* Oestrogen receptor-co-factor chromatin specificity in the transcriptional regulation of breast cancer. *EMBO J.* **30**, 4764–4776 (2011).
146. Lupien, M. *et al.* Growth factor stimulation induces a distinct ER α cistrome underlying breast cancer endocrine resistance. *Genes Dev.* **24**, 2219–2227 (2010).

147. Kim, D. *et al.* Enzymatic activity is required for the in Vivo functions of CARM1. *J. Biol. Chem.* **285**, 1147–1152 (2010).
148. Lupien, M. *et al.* Coactivator function defines the active estrogen receptor alpha cistrome. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3413–3423 (2009).
149. Zhang, X. *et al.* Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13331–13336 (2012).
150. Pappas, T. C., Gametchu, B. & Watson, C. S. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* **9**, 404–10 (1995).
151. Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1996–2009 (2006).
152. Razandi, M. *et al.* Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1633–46 (2003).
153. Pedram, A. *et al.* A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **282**, 22278–22288 (2007).
154. Acconcia, F. *et al.* Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: Regulation by 17beta-estradiol. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1–13 (2005).
155. Razandi, M., Pedram, A. & Levin, E. R. Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3249–3261 (2010).
156. Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L. & Levin, E. R. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2854–2865 (2004).
157. Kumar, P. *et al.* Direct interactions with G α i and G β γ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α . *Mol. Endocrinol.* **21**, 1370–1380 (2007).

158. Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T. & Levin, E. R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 2701–2712 (2003).
159. Song, R. X. *et al.* The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2076–2081 (2004).
160. Anbalagan, M. & Rowan, B. G. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **418**, 264–272 (2015).
161. Thomas, R. S., Sarwar, N., Phoenix, F., Coombes, R. C. & Ali, S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- α activity. *J. Mol. Endocrinol.* **40**, 173–184 (2008).
162. Williams, C. C. *et al.* Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor α : Impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem.* **10**, 1–18 (2009).
163. Al-Dhaheri, M. H. & Rowan, B. G. Application of phosphorylation site-specific antibodies to measure nuclear receptor signaling: characterization of novel phosphoantibodies for estrogen receptor α . *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e007 (2006).
164. Shah, Y. M. & Rowan, B. G. The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor α promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol. Endocrinol.* **19**, 732–748 (2004).
165. Rogatsky, I., Trowbridge, J. M. & Garabedian, M. J. Potentiation of human estrogen receptor α transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 22296–22302 (1999).
166. Medunjanin, S. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor α and is involved in the regulation of receptor activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 33006–33014 (2005).
167. Chen, D. *et al.* Phosphorylation of human estrogen receptor α at serine 118 by two

- distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* **21**, 4921–4931 (2002).
168. Weitsman, G. E. *et al.* Estrogen receptor- α phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res.* **66**, 10162–10170 (2006).
 169. Bunone, G., Briand, P., Miksicek, R. J. & Picard, D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* **15**, 2174–2183 (1996).
 170. Cheng, J., Zhang, C. & Shapiro, D. J. A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor- α is required for down-regulation of gene expression by 17 β -estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology* **148**, 4634–4641 (2007).
 171. Bergqvist, J. *et al.* Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor α are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen. *Eur. J. Cancer* **42**, 1104–1112 (2006).
 172. Murphy, L. C., Niu, Y., Snell, L. & Watson, P. Phospho-serine-118 estrogen receptor- α expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5902–5906 (2004).
 173. Murphy, L. *et al.* Phospho-Serine-118 Estrogen Receptor- α Detection in Human Breast Tumors in Vivo. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1354–1359 (2004).
 174. Arnold, S. F., Obourn, J. D., Jaffe, H. & Notides, A. C. Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: Consequence on DNA binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55**, 163–172 (1995).
 175. Arnold, S. F., Obourn, J. D., Jaffe, H. & Notides, A. C. Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1208–1214 (1994).
 176. Joel, P. B. *et al.* pp90 rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1978–1984 (2015).

177. Likhite, V. S., Stossi, F., Kim, K., Katzenellenbogen, B. S. & Katzenellenbogen, J. A. Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic Acid, and coregulators Associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol. Endocrinol.* **20**, 3120–3132 (2006).
178. Orimo, A. *et al.* The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 122–126 (2002).
179. Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B. & Katzenellenbogen, B. S. Impact of estrogen receptor β on gene networks regulated by estrogen receptor α in breast cancer cells. *Endocrinology* **147**, 4831–4842 (2006).
180. Williams, C., Edvardsson, K., Lewandowski, S. A., Ström, A. & Gustafsson, J. Å. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* **27**, 1019–1032 (2008).
181. Liu, Y., Gao, H. & Torben, T. Correction for Liu et al., The genome landscape of ER α - and ER β -binding DNA regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 1460–1461 (2019).
182. Strom, A. *et al.* Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 1566–1571 (2004).
183. Zhao, C. *et al.* Estrogen receptor β 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 3955–3962 (2007).
184. Roger, P. *et al.* Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* **61**, 2537–2541 (2001).
185. Wend, K., Wend, P. & Krum, S. A. Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 19 (2012).
186. Fisher, B. *et al.* Tamoxifen for the prevention of breast cancer: Current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.*

- 97**, 1652–1662 (2005).
187. Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* **125**, 411–414 (2006).
 188. Prossnitz, E. R. & Arterburn, J. B. International union of basic and clinical pharmacology. XCVII. G protein-coupled estrogen receptor and its pharmacologic modulators. *Pharmacol. Rev.* **67**, 505–540 (2015).
 189. Aquila, H., Link, T. A. & Klingenberg, M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* **4**, 2369–76 (1985).
 190. Timmons, J. A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 4401–4406 (2007).
 191. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).
 192. Yin, H. *et al.* MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab.* **17**, 210–224 (2013).
 193. Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* **16**, 348–362 (2012).
 194. Shao, D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **272**, 21473–21478 (1997).
 195. Morrison, R. F. & Farmer, S. R. Role of PPAR γ in regulating a cascade expression of cyclin-dependant kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21 (Waf1/Cip1), during adipogenesis. *Biochemistry* **274**, 17088–17097 (1999).
 196. Leonardsson, G. *et al.* Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat

- accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8437–8442 (2004).
197. Picard, F. *et al.* SRC-1 and TIF2 Control Energy Balance between White and Brown Adipose Tissues coregulators modulate NR function in vitro, their role in vivo has not yet been fully explored. Mice deficient for individual members of the p160 family are characterized. *Cell* **111**, 931–941 (2002).
 198. Teruel, T., Clapham, J. C. & Smith, S. A. PPAR α activation by Wy 14643 induces transactivation of the Rat UCP-1 promoter without increasing UCP-1 mRNA levels and attenuates PPAR γ -mediated increases in UCP-1 mRNA levels induced by rosiglitazone in fetal rat brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 311–315 (1999).
 199. Xue, B., Coulter, A., Rim, J. S., Koza, R. a & Kozak, L. P. Transcriptional Synergy and the Regulation of Ucp1 during Brown Adipocyte Induction in White Fat Depots. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8311–8322 (2005).
 200. Cederberg, A. *et al.* FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563–573 (2001).
 201. Wu, Z. *et al.* Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* **119**, 121–135 (2004).
 202. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
 203. Hansen, J. B. & Kristiansen, K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation: Figure 1. *Biochem. J.* **398**, 153–168 (2006).
 204. Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76–83 (2014).
 205. Roh, H. C. *et al.* Warming induces significant reprogramming of beige, but not brown, adipocyte cellular identity. *Cell Metab.* **27**, 1121-1137.e5 (2018).
 206. Young, P., Arch, J. R. S. & Ashwell, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* **167**, 10–14 (1984).

207. Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Metab.* **298**, E1244–E1253 (2010).
208. Nagase, I. *et al.* Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic β 3-adrenergic agonist. *J. Clin. Invest.* **97**, 2898–2904 (1996).
209. Vernochet, C. *et al.* C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4714–4728 (2009).
210. Kajimura, S. *et al.* Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* **22**, 1397–1409 (2008).
211. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M. & Kajimura, S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* **15**, 395–404 (2012).
212. Kleiner, S. *et al.* Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9635–9640 (2012).
213. Moisan, A. *et al.* White-to-brown metabolic conversion of human adipocytes by JAK inhibition. *Nat. Cell Biol.* **17**, 57–67 (2015).
214. De Meyts, P. The insulin receptor and its signal transduction network. in *Endotext* (2016).
215. White, M. F. *et al.* Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* **54**, 641–649 (1988).
216. Sun, X. J. *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73–77 (2003).
217. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. & Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 85–96 (2006).

218. Clarke, J. F., Young, P. W., Yonezawa, K., Kasuga, M. & Holman, G. D. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem. J.* **300**, 631–635 (2015).
219. Hara, K. *et al.* 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7415–7419 (1994).
220. Sturgill, T. W. & Ray, L. B. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 565–571 (1986).
221. Avruch, J. MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1150–1160 (2007).
222. Lewis C. Cantley. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (80-.)*. **296**, 1655–1658 (2002).
223. Kane, S. *et al.* A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 22115–22118 (2002).
224. Sano, H. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **278**, 14599–14602 (2003).
225. Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O’Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 502–513 (1998).
226. Harris, T. E. & Lawrence, J. C. TOR signaling. *Sci. STKE* **2003**, re15 (2003).
227. Cross, D. A. E., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–789 (1995).
228. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).

229. Biggs, W. H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K. & Arden, K. C. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7421–6 (1999).
230. Tang, E. D., Nuñez, G., Barr, F. G. & Guan, K. L. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J. Biol. Chem.* **274**, 16741–16746 (1999).
231. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. & Greenberg, M. E. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* **2003**, re5 (2003).
232. Rylatt, D. B. *et al.* Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle: Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **107**, 529–537 (1980).
233. Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550–555 (2003).
234. Carpentier, J. L. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia* **37**, S117–S124 (1994).
235. Galic, S., Sachithanandan, N., Kay, T. W. & Steinberg, G. R. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochem. J* **461**, 177–188 (2014).
236. Harris, R. A. Studies on the inhibition of hepatic lipogenesis by N6,02'-Dibutyryl Adenosine 3',5'-Monophosphate. *Arch. s Biochem. Biophys.* **169**, 168–180 (1975).
237. Clarke, B. A. & Clarke, S. D. Suppression of rat liver fatty acid synthesis by eicosa-5,8,11,14-tetraynoic acid without a reduction in lipogenic enzymes. *J. Nutr.* **112**, 1212–1219 (1982).
238. Bódis, K. & Roden, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, (2018).
239. Nakamura, M. T., Yudell, B. E. & Loor, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **53**, 124–144 (2014).

240. Olivecrona, G. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **27**, 233–241 (2016).
241. Raajendiran, A., Tsiloulis, T. & Watt, M. J. Adipose tissue development and the molecular regulation of lipid metabolism. *Essays Biochem.* **60**, 437–450 (2016).
242. Zimmermann, R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (80-.)*. **306**, 1383–1386 (2004).
243. Jenkins, C. M. *et al.* Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A 2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J. Biol. Chem.* **279**, 48968–48975 (2004).
244. Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. & Hei, S. S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: Ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 47066–47075 (2004).
245. Moczulski, D., Majak, I. & Mamczur, D. An overview of beta-oxidation disorders. *Postep. Hig Med Dosw* **63**, 266–277 (2009).
246. Daval, M., Foufelle, F. & Ferré, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J. Physiol.* **574**, 55–62 (2006).
247. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
248. Fenzl, A. & Kiefer, F. W. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Invest* **19**, 25–37 (2014).
249. Lafontan, M. & Berlan, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* **34**, 1057–91 (1993).
250. Richelsen, B., Pedersen, S. B., Moller-Pedersen, T. & Bak, J. F. Regional differences in triglyceride effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2. *Metabolism* **40**, 990–996 (1991).

251. Pagnon, J. *et al.* Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* **153**, 4278–4289 (2012).
252. Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N. O. & Belfrage, P. Hormone-sensitive Lipase of Rat Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* **256**, 6311–6320 (1981).
253. Stralfors, P., Bjorgell, P. & Belfrage, P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3317–3321 (2006).
254. Egan, J. J. *et al.* Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8537–8541 (2006).
255. Tansey, J. T. *et al.* Functional studies on native and mutated forms of perilipins. *J. Biol. Chem.* **278**, 8401–8406 (2003).
256. Miyoshi, H. *et al.* Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase α -stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 996–1002 (2007).
257. Miyoshi, H. *et al.* Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **281**, 15837–15844 (2006).
258. Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. & Brasaemle, D. L. The phosphorylation of serine 492 of perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J. Biol. Chem.* **281**, 11901–11909 (2006).
259. Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G. & Feng, H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell* **9**, 216–237 (2018).
260. Byron, O. & Lindsay, J. G. The pyruvate dehydrogenase complex and related assemblies in health and disease. in *Macromolecular Protein Complexes* **83**, 523–550 (2017).

261. Jeoung, N. H. Pyruvate dehydrogenase kinases: Therapeutic targets for diabetes and cancers. *Diabetes Metab. J.* **39**, 188–197 (2015).
262. Letts, J. A. & Sazanov, L. A. Clarifying the supercomplex: The higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 800–808 (2017).
263. Van Der Bliek, A. M., Sedensky, M. M. & Morgan, P. G. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* **207**, 843–871 (2017).
264. Lindberg, O., De Pierre, J., Rylander, E. & Afzelius, B. A. Studies of the mitochondrial system energy-transfer of adipose tissue. *J. Cell Biol.* **34**, 293–310 (1967).
265. Matthias, A. *et al.* Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. *J. Biol. Chem.* **275**, 25073–25081 (2000).
266. Smith, R. E., Roberts, J. C. & Hittelman, K. J. Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. *Science (80-.).* **154**, 653–654 (1966).
267. Monteiro, R., Teixeira, D. & Calhau, C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–20 (2014).
268. Knowlton, A. A. & Korzick, D. H. Estrogen and the female heart. *Mol. Cell. Endocrinol.* **389**, 31–39 (2014).
269. Mauvais-jarvis, F. *Sex and gender factors affecting metabolic homeostasis, diabetes and obesity.* **1043**, (2017).
270. Newell-Fugate, A. E. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction* **153**, R133–R149 (2017).
271. Sirmans, S. M. & Pate, K. A. Epidemiology, diagnosis and management of polycystic ovary syndrome. *Clin. Epidemiol.* **18**, 235–244 (2013).
272. Tchernof, A. & Poehlman, E. T. Effects of the menopause transition on body fatness and body fat distribution. *Obes. Res.* **6**, 246–254 (1998).

273. D'Eon, T. M. *et al.* Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J. Biol. Chem.* **280**, 35983–35991 (2005).
274. Tchernof, A. *et al.* Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3425–3430 (2004).
275. Urabe, M. *et al.* Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocr. J.* **43**, 737–742 (1996).
276. Palin, S. L. *et al.* 17 β -estradiol and anti-estrogen ICI:compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism.* **52**, 383–388 (2003).
277. Bryzgalova, G. *et al.* Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am. J. Physiol. Metab.* **295**, E904–E912 (2008).
278. Santollo, J., Wiley, M. D. & Eckel, L. A. Acute activation of ER α decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R2194–R2201 (2007).
279. Pedersen, S. B., Kristensen, K., Hermann, P. a, Katzenellenbogen, J. a & Richelsen, B. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 1869–78 (2004).
280. Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B. & Cooke, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12729–12734 (2000).
281. Walker, V. R. & Korach, K. S. Estrogen receptor knockout mice as a model for endocrine research. *ILAR J.* **45**, 455–461 (2004).
282. Davis, K. E. *et al.* Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor

- (GPER) in modulating energy homeostasis. *Horm. Behav.* **66**, 1–12 (2014).
283. Roesch, D. M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior* **87**, 39–44 (2006).
 284. Foryst-Ludwig, A. *et al.* Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet.* **4**, e1000108 (2008).
 285. de sá, P. M., Richard, A. J., Hang, H. & Stephens, J. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Compr. Physiol.* **7**, 635–674 (2017).
 286. Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H. & Marette, A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (ζ/λ) activities. *Diabetes* **50**, 1901–1910 (2001).
 287. Ribas, V. *et al.* Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E304-19 (2010).
 288. Gorres, B. K., Bomhoff, G. L., Gupte, A. A. & Geiger, P. C. Altered estrogen receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue of female rats fed a high-fat diet. *J. Appl. Physiol.* **110**, 1046–1053 (2011).
 289. Manrique, C. *et al.* Loss of estrogen receptor alpha signaling leads to insulin resistance and obesity in young and adult female mice. *Cardiorenal Med.* **2**, 200–210 (2012).
 290. Metz, L. *et al.* Nutritional and exercise interventions variably affect estrogen receptor expression in the adipose tissue of male rats. *Nutr. Res.* **36**, 280–289 (2016).
 291. Rüegg, J. *et al.* Epigenetic regulation of glucose transporter 4 by estrogen receptor β . *Mol. Endocrinol.* **25**, 2017–2028 (2011).
 292. Muraki, K., Okuya, S. & Tanizawa, Y. Estrogen receptor α regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes.

Endocr. J. **53**, 841–851 (2006).

293. Nagira, K. *et al.* Altered subcellular distribution of estrogen receptor α is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **147**, 1020–1028 (2006).
294. Sharma, G. & Prossnitz, E. R. G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) and sex-specific metabolic homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1043**, 427–453 (2017).
295. Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C. & Yager, J. D. Mitochondrial localization of ER α and ER β in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Metab.* **286**, E1011–E1022 (2004).
296. Martensson, U. E. A. *et al.* Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* **150**, 687–698 (2009).
297. Bauzá-Thorbrügge, M. *et al.* GPER and ER α mediate estradiol enhancement of mitochondrial function in inflamed adipocytes through a PKA dependent mechanism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **185**, 256–267 (2019).
298. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509–1526 (2009).
299. Monjo, M., Rodríguez, A. M., Palou, A. & Roca, P. Direct effects of testosterone, 17 β -estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology* **144**, 4923–4930 (2003).
300. Rodríguez, E. *et al.* Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **442**, 396–403 (2001).
301. Rodríguez-Cuenca, S. *et al.* Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **277**, 42958–42963 (2002).

302. Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Kristensen, K. & Richelsen, B. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 191–197 (2001).
303. Martínez de Morentin, P. B. *et al.* Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab.* **1**, 1–13 (2014).
304. Santos, R. S. *et al.* Activation of estrogen receptor alpha induces beiging of adipocytes. *Mol. Metab.* **18**, 51–59 (2018).
305. McGown, C., Bирerdinc, A. & Younossi, Z. M. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin. Liver Dis.* **18**, 41–58 (2014).
306. Reverchon, M., Ramé, C., Bertoldo, M. & Dupont, J. Adipokines and the female reproductive tract. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, 232454 (2014).
307. Wasim, M., Awan, F. R., Najam, S. S., Khan, A. R. & Khan, H. N. Role of leptin deficiency, inefficiency, and leptin receptors in obesity. *Biochem. Genet.* **54**, 565–572 (2016).
308. Hickey, M. S. *et al.* Gender differences in serum leptin levels in humans. *Biochem. Mol. Med.* **59**, 1–6 (1996).
309. Hong, S. C. *et al.* Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* **14**, 835–840 (2007).
310. Hellström, L., Wahrenberg, H., Hruska, K., Reynisdottir, S. & Arner, P. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J. Intern. Med.* **247**, 457–462 (2000).
311. Fungfuang, W. *et al.* Serum leptin concentrations, leptin mRNA expression, and food intake during the estrous cycle in rats. *Lab. Anim. Res.* **29**, 1 (2013).
312. Fungfuang, W., Terada, M., Komatsu, N., Moon, C. & Saito, T. R. Effects of estrogen on food intake, serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue of female rats. *Lab. Anim. Res.* **29**, 168 (2013).

313. Machinal, F., Dieudonne, M.-N., Leneveu, M.-C., Pecquery, R. & Guidicelli, Y. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* **140**, 1567–1574 (1999).
314. Van Sinderen, M. L. *et al.* Effects of estrogens on adipokines and glucose homeostasis in female aromatase knockout mice. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
315. Pektaş, M., Kurt, A. H., Ün, I., Tiftik, R. N. & Büyükaşar, K. Effects of 17 β -estradiol and progesterone on the production of adipokines in differentiating 3T3-L1 adipocytes: Role of Rho-kinase. *Cytokine* **72**, 130–134 (2015).
316. Fu, M. *et al.* A nuclear receptor atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2437–2450 (2005).
317. J. Diez, J. & Iglesias, P. The role of the novel adipocyte-derived protein adiponectin in human disease: An update. *Mini-Reviews Med. Chem.* **10**, 856–869 (2010).
318. Arita, Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83 (1999).
319. Combs, T. P. *et al.* Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* **52**, 268–276 (2003).
320. Horenburg, S., Fischer-Posovszky, P., Debatin, K. M. & Wabitsch, M. Influence of sex hormones on adiponectin expression in human adipocytes. *Horm. Metab. Res.* **40**, 779–786 (2008).
321. Scheller, E. L., Burr, A. A., MacDougald, O. A. & Cawthorn, W. P. Inside out: Bone marrow adipose tissue as a source of circulating adiponectin. *Adipocyte* **5**, 251–269 (2016).
322. Park, H. K. & Ahima, R. S. Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab. J.* **37**, 404–414 (2013).
323. Stepan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**,

307–312 (2001).

- 324. Ort, T. *et al.* Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *Endocrinology* **146**, 2200–2209 (2005).
- 325. Chen, N. *et al.* Resistin induces lipolysis and suppresses adiponectin secretion in cultured human visceral adipose tissue. *Regul. Pept.* **194–195**, 49–54 (2014).
- 326. Kim, K.-H., Zhao, L., Moon, Y., Kang, C. & Sul, H. S. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6780–6785 (2004).
- 327. Caja, S. & Puerta, M. Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Horm. Metab. Res.* **39**, 501–506 (2007).
- 328. Huang, S. W. *et al.* Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett.* **579**, 449–454 (2005).
- 329. Martos-Moreno, G. Á., Barrios, V. & Argente, J. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: relationship with sex steroids. *Eur. J. Endocrinol.* **155**, 429–434 (2006).
- 330. Hevener, A. L., Zhou, Z., Moore, T. M., Drew, B. G. & Ribas, V. The impact of ER α action on muscle metabolism and insulin sensitivity – Strong enough for a man, made for a woman. *Mol. Metab.* **15**, 20–34 (2018).
- 331. Rogers, N. H., Witczak, C. A., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. & Greenberg, A. S. Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 646–650 (2009).
- 332. Gorres, B. K., Bomhoff, G. L., Morris, J. K. & Geiger, P. C. In vivo stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *J. Physiol.* **589**, 2041–2054 (2011).
- 333. Bryzgalova, G. *et al.* Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in

the regulation of glucose homeostasis in mice: Insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* **49**, 588–597 (2006).

334. Ribas, V. *et al.* Skeletal muscle action of estrogen receptor α is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. *Sci Transl Med* **8**, (2016).
335. Riant, E. *et al.* Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **150**, 2109–2117 (2009).
336. Torres, M. J. *et al.* 17β -estradiol directly lowers mitochondrial membrane microviscosity and improves bioenergetic function in skeletal muscle. *Cell Metab.* **27**, 167-179.e7 (2018).
337. Drew, B. G. *et al.* Estrogen receptor (ER) α -regulated lipocalin 2 expression in adipose tissue links obesity with breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* **290**, 5566–5581 (2015).
338. Maher, A. C., Akhtar, M. & Tarnopolsky, M. a. Men supplemented with 17β -estradiol have increased beta-oxidation capacity in skeletal muscle. *Physiol. Genomics* **42**, 342–347 (2010).
339. Fu, M. H., Maher, A. C., Hamadeh, M. J., Ye, C. & Tarnopolsky, M. A. Exercise, sex, menstrual cycle phase, and 17β -estradiol influence metabolism-related genes in human skeletal muscle. *Physiol. Genomics* **40**, 34–47 (2009).
340. Campbell, S. E., Mehan, K. A., Tunstall, R. J., Febbraio, M. A. & Cameron-Smith, D. 17β -estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α and lipid oxidative genes in skeletal muscle. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 37–45 (2003).
341. Brüning, J. C. *et al.* A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* **2**, 559–69 (1998).
342. Michael, M. D. *et al.* Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* **6**, 87–97 (2000).

343. Paquette, A., Shinoda, M., Lhoret, R. R., Prud'homme, D. & Lavoie, J. M. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: Impact of a high-fat diet. *Maturitas* **58**, 182–190 (2007).
344. Côté, I. *et al.* Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. *Climacteric* **15**, 594–601 (2012).
345. Gao, H., Fält, S., Sandelin, A., Gustafsson, J.-A. & Dahlman-Wright, K. Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Mol. Endocrinol.* **22**, 10–22 (2008).
346. Gao, H. *et al.* Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: A possible mechanism is through Direct Regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1287–1299 (2006).
347. Zhang, H. *et al.* Differential effects of estrogen/androgen on the prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the male rat. *J. Lipid Res.* **54**, 345–357 (2013).
348. Zhu, L. *et al.* Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes* **62**, 424–434 (2013).
349. Pedram, A. *et al.* Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci. Signal.* **6**, 1–13 (2013).
350. Kim, J. H. *et al.* Tissue-selective estrogen complexes with bazedoxifene prevent metabolic dysfunction in female mice. *Mol. Metab.* **3**, 177–90 (2014).
351. Villa, A. *et al.* Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11806–11 (2012).
352. Palierne, G. *et al.* Changes in gene expression and estrogen receptor cistrome in mouse liver upon acute E2 treatment. *Mol. Endocrinol.* **30**, 709–732 (2016).
353. Gordon, F. K. *et al.* Research resource: Aorta- and liver-specific ER α -binding patterns and gene regulation by estrogen. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1337–51 (2014).
354. Della Torre, S. *et al.* Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor

- alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab.* **13**, 205–14 (2011).
355. Matic, M. *et al.* Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor alpha action. *PLoS One* **8**, e57458 (2013).
356. Della Torre, S. *et al.* Short-term fasting reveals amino acid metabolism as a major sex-discriminating factor in the liver. *Cell Metab.* **28**, 256–267 (2018).
357. Tiano, J. P. & Mauvais-Jarvis, F. Importance of oestrogen receptors to preserve functional β -cell mass in diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 342–51 (2012).
358. Le May, C. *et al.* Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9232–9237 (2006).
359. Kilic, G. *et al.* The islet estrogen receptor- α is induced by hyperglycemia and protects against oxidative stress-induced insulin-deficient diabetes. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
360. Tiano, J. P. *et al.* Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents β cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **121**, 3331–3342 (2011).
361. Alonso-Magdalena, P. *et al.* Pancreatic insulin content regulation by the Estrogen receptor ER α . *PLoS One* **3**, (2008).
362. Wong, W. P. S. *et al.* Extranuclear estrogen receptor- stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13057–13062 (2010).
363. Tiano, J. P. & Mauvais-Jarvis, F. Molecular mechanisms of estrogen receptors' suppression of lipogenesis in pancreatic β -cells. *Endocrinology* **153**, 2997–3005 (2012).
364. Liu, S. & Mauvais-Jarvis, F. Rapid, nongenomic estrogen actions protect pancreatic islet survival. *Islets* **1**, 273–275 (2009).

365. Liu, S. *et al.* Importance of extranuclear estrogen receptor- α and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes* **58**, 2292–2302 (2009).
366. Xu, B. *et al.* Estrogens promote misfolded proinsulin degradation to protect insulin production and delay diabetes. *Cell Rep.* **24**, 181–196 (2018).
367. Wade, G. N. & Gray, J. M. Gonadal effects on food intake and adiposity: A metabolic hypothesis. *Physiol. Behav.* **22**, 583–593 (1979).
368. Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C. & Muramatsu, M. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **294**, 76–95 (1990).
369. Hirosawa, M. *et al.* Ablation of estrogen receptor alpha (ER α) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 320–323 (2008).
370. Xu, Y. *et al.* Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab.* **14**, 453–465 (2011).
371. King, B. M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* **87**, 221–244 (2006).
372. Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J. H. & Parker, K. L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**, 478–86 (1995).
373. Delovade, T. L. *et al.* Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J. Comp. Neurol.* **423**, 579–589 (2000).
374. Majdic, G. *et al.* Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* **143**, 607–614 (2002).
375. Musatov, S. *et al.* Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2501–

2506 (2007).

- 376. Diano, S., Kalra, S. P., Sakamoto, H. & Horvath, T. L. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res.* **812**, 256–259 (1998).
- 377. Bennett, P. A. *et al.* Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* **69**, 417–423 (1999).
- 378. Ainslie, D. A. *et al.* Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int. J. Obes.* **25**, 1680–1688 (2001).
- 379. Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C. & Benoit, S. C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* **55**, 978–87 (2006).
- 380. Jeong, J. Y., Jeoung, N. H., Park, K.-G. & Lee, I.-K. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab. J.* **36**, 328 (2012).
- 381. Yeaman, S. J. *et al.* Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Biochemistry* **17**, 2364–2370 (1978).
- 382. Pilegaard, H. & Darrell Neuffer, P. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 221–226 (2004).
- 383. Stacpoole, P. W. Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **109**, 1–14 (2017).
- 384. Yadav, R. N. S. & Singh, S. N. Regulation of rat liver NADP⁺-isocitrate dehydrogenase during aging. *J. Biosci.* **2**, 15–22 (1980).
- 385. Lappano, R. *et al.* The cholesterol metabolite 25-Hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -Mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS One* **6**, (2011).
- 386. Marlatt, K. L. & Ravussin, E. Brown adipose tissue: an update on recent findings.

Curr Obes Rep **6**, 389–396 (2017).

387. Ricquier, D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* **134**, 3–8 (2017).
388. Frank, A. P., Palmer, B. F. & Clegg, D. J. Do estrogens enhance activation of brown and beige of adipose tissues? *Physiol. Behav.* **187**, 24–31 (2018).
389. Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J. & Aouadi, M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* **56**, 949–964 (2013).
390. Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M. & Kandror, K. V. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* **59**, 775–781 (2010).
391. Arner, P. & Langin, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 255–262 (2014).
392. Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. & White, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* **277**, 42394–42398 (2002).
393. Matthews, J., Almlöf, T., Kietz, S., Leers, J. & Gustafsson, J. Å. Estrogen receptor- α regulates SOCS-3 expression in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 168–174 (2005).
394. Wada, N. *et al.* Leptin and its receptors. *J. Chem. Neuroanat.* 1–9 (2014). doi:10.1016/j.jchemneu.2014.09.002
395. Root-Bernstein, R., Podufaly, A. & Dillon, P. F. Estradiol binds to insulin and insulin receptor decreasing insulin binding in vitro. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 118 (2014).
396. Søndergaard, E., De Ycaza, A. E. E., Morgan-Bathke, M. & Jensen, M. D. How to measure adipose tissue insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 1193–1199 (2017).
397. Hancock, M. L. *et al.* Insulin receptor associates with promoters genome-wide and

- regulates gene expression. *Cell* **177**, 722-736.e22 (2019).
398. Bell, C. G. The epigenomic analysis of human obesity. *Obesity* **25**, 1471–1481 (2017).
 399. Kim, M. & Costello, J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. *Exp. Mol. Med.* **49**, e322-8 (2017).
 400. Bogdanović, O. & Lister, R. DNA methylation and the preservation of cell identity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **46**, 9–14 (2017).
 401. Kim, A. Y. *et al.* Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
 402. You, D. *et al.* Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. *Elife* **6**, 1–20 (2017).
 403. Day, J. K. *et al.* Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.* **132**, 2419S-2423S (2002).
 404. Sato, N. *et al.* Genome-wide dna methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation. *PLoS One* **6**, (2011).
 405. Yan, L. *et al.* Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor α (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 552–556 (2003).
 406. Marques, M., Laflamme, L. & Gaudreau, L. Estrogen receptor α can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8094–8106 (2013).
 407. Mohammed, H. *et al.* Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep.* **3**, 342–9 (2013).
 408. Klein, K. O. *et al.* Effect of obesity on estradiol level, and its relationship to leptin, bone maturation, and bone mineral density in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3469–3475 (2014).

409. Zhou, Z., Zhou, J. & Du, Y. Estrogen receptor alpha interacts with mitochondrial protein HADHB and affects beta-oxidation activity. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.011056 (2012).
410. Zhou, Z., Zhou, J. & Du, Y. Estrogen receptor beta interacts and colocalizes with HADHB in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 305–308 (2012).
411. Yan, Y., Yu, L., Castro, L. & Dixon, D. ER α 36, a variant of estrogen receptor α , is predominantly localized in mitochondria of human uterine smooth muscle and leiomyoma cells. *PLoS One* **12**, 1–15 (2017).
412. Allard, C. *et al.* Loss of nuclear and membrane estrogen receptor- α differentially impairs insulin secretion and action in Male and female mice. *Diabetes* **68**, 490–501 (2019).
413. Pedram, A., Razandi, M., Blumberg, B. & Levin, E. R. Membrane and nuclear estrogen receptor α collaborate to suppress adipogenesis but not triglyceride content. *FASEB J.* **30**, 230–240 (2016).
414. Pedram, A. *et al.* Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor α (MOER) mouse. *J. Biol. Chem.* **284**, 3488–3495 (2009).
415. Jones, M. E. *et al.* Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12735–12740 (2000).
416. Pedersen, S. B. *et al.* Demonstration of estrogen receptor subtypes α and β in human adipose tissue: Influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Mol. Cell. Endocrinol.* **182**, 27–37 (2001).
417. Dieudonné, M. N., Leneuve, M. C., Giudicelli, Y. & Pecquery, R. Evidence for functional estrogen receptors α and β in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Physiol.* **286**, C655–C661 (2004).
418. Holland, A. M. *et al.* Testosterone inhibits expression of lipogenic genes in visceral fat by an estrogen-dependent mechanism. *J. Appl. Physiol.* **121**, 792–805 (2016).

